

Untersuchung der DNA-Schadensantwort in der murinen Retina nach ionisierender Strahlung



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

Dipl.-Biol. Antonia Frohns

aus Riesa

1. Referent/ Referentin: Prof. Dr. Markus Löbrich


2. Referent/Referentin: Prof Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 23.07.2013

Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2013

Darmstadt 2013

D 17



Klar nennt man Ideen, die dasselbe Maß an Verwirrung haben wie unser eigener Geist.

Marcel Proust

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	ii
Abkürzungsverzeichnis	iii
1. ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY	1
2. EINLEITUNG	4
2.1. Physikalische Grundlagen ionisierender Strahlung	4
2.1.1. Elektromagnetische Strahlung und ihre Wechselwirkung mit Materie	4
2.1.2. Schwerionenstrahlung und ihre Wechselwirkung mit Materie	5
2.1.3. Linearer Energie Transfer und Relative Biologische Wirksamkeit	6
2.1.4. Direkte und indirekte Strahleneffekte im biologischen System	6
2.1.5. Arten strahleninduzierter DNA-Schäden	7
2.2. Zelluläre Schadensantwort auf DNA-DSBs in eukaryotischen Zellen	8
2.2.1. Erkennung von DNA-DSBs	8
2.2.2. Reparatur von DNA-DSBs	9
2.2.3. Chromatindynamik in der DSB-Reparatur	12
2.3. Einfluss von Laminen auf die Chromatinorganisation und DNA-Schadensantwort	15
2.4. Charakterisierung verwendeter Mausstämme	16
2.5. Die Mausretina als Modellsystem zur Untersuchung der DSB-Reparatur in verschiedenen Chromatin-Bereichen	17
2.5.1. Entwicklung und Aufbau der Mausretina	17
2.5.2. Die Photorezeptoren	20
2.5.3. Chromatinstruktur von Stäbchen-Photorezeptoren der Mausretina	20
2.5. Zielsetzung	22
3. MATERIAL UND METHODEN	23
3.1. Material	23
3.1.1. Chemikalien	23
3.1.2. Lösungen	23
3.1.3. Antikörper	25
3.1.4. Inhibitoren	25
3.1.5. Zelllinien	25
3.1.6. Mausstämme	25
3.1.7. Geräte und Softwareprogramme	26
3.1.8. Sonstige Verbrauchsmaterialien	27
3.2. Methoden	27
3.2.1. Zellkultur	27
3.2.2. Bestrahlung von Zellen mit Röntgenstrahlung	28
3.2.3. Fixierung von Zellen	28
3.2.4. Bestrahlung von Mäusen mit Röntgenstrahlung	28
3.2.5. Präparation von Mäusen und Fixierung von Maus-Organen	29
3.2.6. Präparation, Bestrahlung und Fixierung von Retina- Explantaten	29

3.2.7.	Einbettung fixierter Maus-Organen und Retina-Explantate in Paraffin und Anfertigung von Paraffin-Gewebeschnitten	30
3.2.8.	Aufbereitung von Gewebeschnitten für die Immunfluoreszenzfärbung	30
3.2.9.	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen und Maus-Geweben	31
3.2.10.	Analyse von G1-Phase Zellen	32
3.2.11.	Aufnahmen und Bildverarbeitung von Immunfluoreszenzfärbungen	33
3.2.12.	Auswertung mittels Foci-Analyse	33
3.2.13.	Statistik	34
3.2.14.	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	35
4.	ERGEBNISSE	37
4.1.	Auftreten von DSB-Markern in der adulten und der postnatalen Mausretina nach Röntgenbestrahlung	37
4.2.	Zelltyp-spezifisches Auftreten strahleninduzierter 53BP1-Foci in der INL der adulten Mausretina nach Röntgenbestrahlung	42
4.3.	Zeitlich begrenzte Ausbildung strahleninduzierter 53BP1-Foci in der ONL der adulten Mausretina nach Röntgenbestrahlung	45
4.4.	DSB-Reparatur in der adulten Mausretina nach Röntgenbestrahlung	46
4.5.	DSB-Reparatur in Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren der adulten Mausretina nach Röntgenbestrahlung	50
4.6.	DSB-Reparatur in Stäbchen-Photorezeptoren der postnatalen Mausretina nach Röntgenbestrahlung	51
4.7.	Einfluss von ATM und DNA-PK auf die Reparatur von DSBs in der adulten Mausretina nach Röntgenbestrahlung	53
4.7.1.	Untersuchung der ATM- und DNA-PK-abhängigen DSB-Reparatur in Stäbchen-Photorezeptoren der adulten Mausretina	53
4.7.2.	Vergleich der ATM- und DNA-PK-abhängigen DSB-Reparatur in Stäbchen-Photorezeptoren der adulten Mausretina mit anderen Maus-Gewebezelltypen	54
4.7.3.	DSB-Reparatur in Stäbchen-Photorezeptoren der adulten Mausretina nach Anwendung von ATM- und DNA-PK Inhibitoren in <i>ex vivo</i> -Kulturen	56
4.8.	Expression und Phosphorylierung von KAP1 in der adulten und der postnatalen Mausretina	60
4.9.	Lokalisation von DSBs innerhalb des Chromatins von Stäbchen-Photorezeptoren der adulten Mausretina nach Röntgenbestrahlung	66
4.10.	Lokalisation von DSBs in Photorezeptoren der adulten Mausretina nach Schwerionenbestrahlung	72
5.	DISKUSSION	75
5.1.	Unterschiede in der DNA-Schadenserkennung in der adulten und postnatalen Mausretina	75
5.1.1.	Fehlende Akkumulation von pATM und 53BP1 an strahleninduzierte DSBs in Bipolarzellen, Zapfen- und Stäbchen-PRs der adulten Mausretina	75
5.1.2.	Annahmen zur Entstehung des 53BP1-Gradienten in der adulten Mausretina	77
5.1.3.	Vor- und Nachteile <i>ex vivo</i> -kultivierter Retina-Explantate	78
5.2.	Unterschiede in der DSB-Reparatur in der adulten und postnatalen Mausretina	79
5.2.1.	Defekt der DSB-Reparatur in Stäbchen-PRs der adulten Mausretina korreliert mit einer verminderten KAP1-Expression und dem Fehlen einer strahleninduzierten Phosphorylierung von KAP1	79
5.2.2.	Der DSB-Reparaturdefekt in Stäbchen-PRs der adulten Mausretina im Kontext zu Laminopathien	82

5.2.3.	Der DSB-Reparaturdefekt in Stäbchen-PRs der adulten Mausretina im Kontext zur Sensitivität dieses Zelltyps gegenüber oxidativem Stress	84
5.2.4.	Relevanz des DSB-Reparaturdefekts in Stäbchen-PRs der adulten Mausretina für den Menschen	84
5.3.	Bewegung strahleninduzierter DSBs innerhalb des Chromatins von Stäbchen-Photorezeptoren der adulten Mausretina nach Schwerionenbestrahlung	85
5.4.	Lokalisation von DSBs innerhalb verschiedener Chromatinbereiche von Stäbchen-PRs der adulten Mausretina nach Röntgenbestrahlung	86
5.4.1.	Einfluss von ATM und DNA-PK auf die Phosphorylierung von H2AX innerhalb verschiedener Chromatinbereiche von Stäbchen-PRs der adulten Mausretina	87
6.	LITERATURVERZEICHNIS	89
7.	ANHANG	105
7.1.	Western Blots	105
7.2.	Danksagung	106
7.3.	Lebenslauf	107
7.4.	Publikationen	107
7.5.	Ehrenwörtliche Erklärung	108

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Materie.	5
Abbildung 2: Darstellung der Ionisationsereignisse entlang einer Teilchenspur von Kohlenstoffionen mit unterschiedlichen Energien.	6
Abbildung 3: Direkte und indirekte Auswirkung ionisierender Strahlung auf die DNA.	7
Abbildung 4: Zelluläre Schadensantwort auf endogen und exogen entstandene DSBs.	8
Abbildung 5: Darstellung der DSB-Signalkaskade.	9
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Beteiligung von HR und NHEJ an der Reparatur von DSBs in verschiedenen Zellzyklusphasen.	10
Abbildung 7: Mechanismen zur Reparatur von DSBs: Homologe Rekombination (HR) und Nicht-homologes Endjoining (NHEJ).	11
Abbildung 8: Aufbau des Chromatins eukaryotischer Zellen.	12
Abbildung 9: Biphasisches Verhalten der Reparatur von DSBs.	13
Abbildung 10: Ausbildung der Zellkernschichten der Mausretina im Laufe der Entwicklung.	17
Abbildung 11: Darstellung der chronologischen Abfolge der Neurogenese verschiedener Retina-Zelltypen während der Entwicklung.	18
Abbildung 12: Aufbau der adulten Retina.	19
Abbildung 13: Morphologie von Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren.	20
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Verteilung von Chromosomen-Subregionen im murinen Zellkern.	21
Abbildung 15: Postnatale Entwicklung von Stäbchen-Photorezeptoren in der Mausretina.	21
Abbildung 16: Aufnahme eines Maus-Retinaexplantats bestehend aus Glaskörper und umgebender Retina.	29
Abbildung 17: Schematische Darstellung der Methode der Immunfluoreszenzfärbung.	31
Abbildung 18: Bestimmung der Lokalisation eines γ H2AX-Focus innerhalb des Zellkerns eines Stäbchen-Photorezeptors mittels Line-Plot Analyse.	34
Abbildung 19: Auftreten von γ H2AX- und 53BP1-Foci in unterschiedlichen Schichten (ONL, INL und GCL) der adulten Mausretina.	38
Abbildung 20: Auftreten von pATM- und 53BP1-Foci in unterschiedlichen Schichten (ONL, INL und GCL) der adulten Mausretina.	39
Abbildung 21: Auftreten von γ H2AX- und 53BP1-Foci in unterschiedlichen Schichten (NBL und GCL) der postnatalen Mausretina (P4).	40
Abbildung 22: Auftreten von pATM- und 53BP1-Foci in unterschiedlichen Schichten (NBL und GCL) der postnatalen Mausretina (P4).	41
Abbildung 23: Auftreten strahleninduzierter 53BP1-Foci in Pax6-positiven Zellen der adulten Mausretina, 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy.	42
Abbildung 24: Auftreten strahleninduzierter 53BP1-Foci in Glutaminsynthetase-positiven Zellen der adulten Mausretina, 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy.	43
Abbildung 25: Auftreten strahleninduzierter 53BP1-Foci in Lim1+2-positiven Zellen der adulten Mausretina, 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy.	44
Abbildung 26: Auftreten strahleninduzierter 53BP1-Foci in Chx10-positiven Zellen der adulten Mausretina, 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy.	45

Abbildung 27: Auftreten von 53BP1-Foci in den Photorezeptoren der ONL der adulten Mausretina während der DSB-Reparatur.	46
Abbildung 28: Untersuchung der DSB-Reparatur in der adulten Mausretina mittels γ H2AX(53BP1)-Foci-Analyse.	48
Abbildung 29: Untersuchung der DSB-Reparatur in der adulten Mausretina mittels PFGE.	50
Abbildung 30: Vergleich der DSB-Reparatur in Stäbchen- und Zapfen-PRs der adulten Mausretina mittels γ H2AX-Foci Analyse.	51
Abbildung 31: Vorkommen von proliferierenden Zellen in der postnatalen Mausretina (P4).	52
Abbildung 32: Untersuchung der DSB-Reparatur in Stäbchen-PRs-Vorläufern der postnatalen Mausretina (P4) mittels γ H2AX-Foci Analyse.	53
Abbildung 33: Untersuchung der ATM- und DNA-PK-abhängigen DSB-Reparatur in Stäbchen-PRs von WT-, AT- und SCID-Mäusen mittels γ H2AX-Foci Analyse.	54
Abbildung 34: Untersuchung der ATM- und DNA-PK-abhängigen DSB-Reparatur in Zapfen-PRs, Zellen der INL und Zellen der Niere von WT-, AT- und SCID-Mäusen mittels γ H2AX-Foci Analyse.	55
Abbildung 35: Untersuchung der DSB-Reparatur in murinen Fibroblasten (NIH-3T3) mittels γ H2AX-Foci Analyse nach Behandlung mit DMSO, ATMi und DNA-PKi.	57
Abbildung 36: Einfluss der <i>ex vivo</i> -Kultivierung mit DMSO auf die Ausbildung von γ H2AX-Foci in verschiedenen Schichten (ONL, INL und GCL) der adulten Mausretina.	58
Abbildung 37: Einfluss der DMSO-, ATMi- und DNA-PKi-Behandlung auf die Ausbildung von γ H2AX-Foci in Zellen der ONL.	59
Abbildung 38: Untersuchung der ATM- und DNA-PK-abhängigen DSB-Reparatur in Stäbchen-PRs von <i>ex vivo</i> -kultivierten Retina-Explantaten nach DMSO-, ATMi- und DNA-PKi-Behandlung mittels γ H2AX-Foci Analyse.	60
Abbildung 39: Vorkommen von KAP1 in unterschiedlichen Schichten (ONL, INL und GCL) der adulten Mausretina.	61
Abbildung 40: Vorkommen von KAP1 innerhalb des Chromatins der adulten Mausretina.	62
Abbildung 41: Vorkommen von pKAP1 in unterschiedlichen Schichten (ONL, INL und GCL) der adulten Mausretina.	63
Abbildung 42: Vorkommen von KAP1 in unterschiedlichen Schichten (NBL und GCL) der postnatalen Mausretina (P4).	64
Abbildung 43: Vorkommen von pKAP1 in unterschiedlichen Schichten (NBL und GCL) der postnatalen Mausretina.	65
Abbildung 44: Vorkommen von KAP1 in Zellen des Ciliarepithels, der Cornea und der Linse adulter und postnataler Mäusen.	65
Abbildung 45: Untersuchung der Lokalisation von DSBs innerhalb des Chromatins von Stäbchen-Photorezeptoren der adulten Mausretina von WT-, AT- und SCID-Mäusen.	68
Abbildung 46: Untersuchung der Lokalisation von DSBs innerhalb des Chromatins von Stäbchen-Photorezeptoren in Retina-Explantaten adulter Mäuse nach DMSO, ATMi und DNA-PKi Behandlung.	71
Abbildung 47: Auftreten von DSBs in der ONL der adulten Mausretina nach Bestrahlung von Retina-Explantaten mit Schwerionen (Titan).	73

Abbildung A1: Western-Blot-Analyse von DNA-Schadensmarkern in Gesamtzellextrakten adulter und postnataler Mausretinae.	105
Abbildung A2: Western-Blot-Analyse von Chromatin-bildenden Proteinen und Histon-Modifikationen in Gesamtzellextrakten adulter und postnataler Mausretinae.	105

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
53BP1	<i>p53 binding protein 1</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
C901	CERN901
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DG	Deckgläschen
DMEM	<i>Dulbecco's minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNA-PK	DNA-Proteinkinase
DNA-PK _{CS}	katalytische Untereinheit der DNA-Proteinkinase
DSB	Doppelstrangbruch
EC	Euchromatin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESB	DNA-Einzelstrangbruch
FA	Formaldehyd
FAR	<i>Fraction of radioactivity released</i>
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
g	Gravitation
G0-Phase	Ruhephase des Zellzyklus
G1-Phase	erste <i>gap</i> -Phase im Zellzyklus
G2-Phase	zweite <i>gap</i> -Phase im Zellzyklus
GCL	Ganglien Cell Layer
Gy	Gray (Einheit der Strahlendosis)
h	Stunde
H ₂ Odest.	Destilliertes Wasser
H ₂ Obidest.	Bi-Destilliertes Wasser

HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)
HC	Heterochromatin
HR	Homologe Rekombination
INL	<i>Inner Nuclear Layer</i>
IR	<i>Ionizing Radiation</i>
J	Joule
K	Kilo
KAP1	<i>Krüppel-Associated Protein 1</i>
kDa	Kilo-Dalton (molare Masse)
keV	Kilo-Elektronenvolt (Spannung)
kg	Kilogramm
kV	Kilo-Volt (Spannung)
l	Liter
LET	Linear energy transfer
m	milli/Meter
M	Molar
Mbp	Megabasenpaar
MDC1	<i>mediator of DNA damage checkpoint 1</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MilliQ	doppelt destilliertes Wasser
min	Minute
ml	Milliliter
MRE11	Meiotic recombination 11
MRN-Komplex	MRE11-RAD50-NBS1-Komplex
NBS1	Nijmegen breakage syndrome protein 1
NEAA	<i>Nonessential amino acids</i>
NHEJ	Nicht homologes Endjoining
nm	Nanometer
ONL	<i>Outer Nuclear Layer</i>
OT	Objektträger
P	Postnatal
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PRs	Photorezeptoren
P/S	Penicillin/Streptomycin

Rad50	<i>DNA repair protein RAD50</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNF8	<i>RING-finger ubiquitin ligase 8</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S-Phase	Synthesisierungsphase im Zellzyklus
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewichtsprozent)
V(D)J	<i>variable (diversity) joining</i>
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta

1. ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) können sowohl durch die Einwirkung ionisierender Strahlung als auch durch andere exogene und endogene Faktoren erzeugt werden. Die Reparatur von DSBs ist ein entscheidender Prozess zur Aufrechterhaltung der genomischen Integrität eines Organismus. Die zelluläre Schadensantwort auf DSBs, bei der es zur Phosphorylierungen von Histonen (z.B. H2AX) und zur Akkumulation von Signalproteinen (z.B. pATM und 53BP1) um den Bereich von DSBs kommt, kann Zelltyp-spezifische Unterschiede aufweisen. Darüber hinaus wurde in den letzten Jahren immer deutlicher, dass auch die Chromatinorganisation einen entscheidenden Einfluss auf die Erkennung und Reparatur von DSBs hat.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Schadenserkenkung sowie die Reparatur von DSBs in der Retina der Maus untersucht, welche im adulten Stadium ein vergleichsweise einfach aufgebautes Gewebe mit einer geringen Anzahl an Zelltypen mit unterschiedlichen Chromatinstrukturen darstellt. Mit Hilfe der γ H2AX-Foci-Analyse und der Methode der Pulsfeldgelelektrophorese konnte festgestellt werden, dass die Stäbchen-Photorezeptoren (Stäbchen-PRs) der Retina adulter Wildtyp (WT)-Mäuse, bei denen das Heterochromatin (HC) in einem einzigen zentral gelegenen Chromocenter angeordnet ist, einen Reparaturdefekt von durch Röntgenstrahlung erzeugten DSBs aufweisen, der sich über mehrere Tage beobachten lässt. Dieser bislang unbekannte Reparaturdefekt konnte weder in anderen Zelltypen der adulten Retina noch in Zellen der Niere, des Gehirns oder in den noch nicht ausdifferenzierten Vorläuferzellen der Stäbchen-PRs postnataler WT-Mäuse (P4) beobachtet werden, bei denen eine konventionelle Chromatinorganisation vorliegt. Interessanterweise weisen weder die Stäbchen-PRs noch die Zapfen-PRs oder die Bipolarzellen der Retina adulter WT-Mäuse eine effiziente Akkumulation von 53BP1 und pATM an strahleninduzierte DSBs auf, obwohl ausschließlich in den Stäbchen-PRs ein Reparaturdefekt von DSBs nach Bestrahlung gezeigt werden konnte. Die Beobachtung, dass in DNA-PK-defizienten SCID-Mäusen eine strahleninduzierte Phosphorylierung von H2AX trotz ausbleibender Akkumulation von pATM stattfindet, deutet darauf hin, dass pATM in diesen Zelltypen dennoch vorhanden ist, da die H2AX-Phosphorylierung in diesen Zellen ausschließlich von ATM und DNA-PK durchgeführt wird. In Studien mit ATM-defizienten AT-Mäusen konnte gezeigt werden, dass der Level an verbleibenden DSBs in den Stäbchen-PRs adulter WT-Mäuse vergleichbar ist mit dem von AT-Mäusen. Die ATM-Defizienz führt zu einer ausbleibenden Phosphorylierung des Heterochromatin-bildenden Faktors KAP1 und einer damit verbundenen fehlenden Relaxation des Chromatins nach Bestrahlung. Dadurch kommt es zu einem Defekt in der Reparatur heterochromatischer DSBs. Auch in den Stäbchen-PRs adulter WT-Mäuse konnte im Rahmen dieser Arbeit eine fehlende Phosphorylierung von KAP1 nach Bestrahlung nachgewiesen werden. In den Zapfen-PRs und den Bipolarzellen der Retina adulter WT-Mäuse, in denen ebenfalls keine effiziente Akkumulation von pATM und 53BP1 an den DSBs zu beobachten war, konnte dagegen eine Phosphorylierung von KAP1 gezeigt werden. Der Reparaturdefekt in Stäbchen-PRs adulter WT-Mäuse korreliert also sowohl mit der einzigartigen Chromatinstruktur als auch mit der fehlenden strahleninduzierten Phosphorylierung von KAP1 in diesem Zelltyp.

Da bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass sich DSBs innerhalb des Chromatins bewegen können, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Transport strahleninduzierter DSBs nach Bestrahlung mit Schwerionen in Stäbchen-PRs adulter WT-Mäuse untersucht. Diese Experimente zeigten, dass auch in diesem Zelltyp bereits kurz nach Bestrahlung ein Transport strahleninduzierter DSBs stattfindet. Des Weiteren wurde die Lokalisation strahleninduzierter γ H2AX-Foci innerhalb des Chromatins der Stäbchen-PRs während der Reparatur nach Röntgenstrahlung analysiert. Dabei wurde ebenfalls die Beteiligung der Kinasen ATM und DNA-PK bei der Phosphorylierung von H2AX innerhalb verschiedener Chromatin-Bereiche untersucht. Zusätzlich zu den *in vivo*-bestrahlten WT-, AT- und SCID-Mäusen wurden dafür *ex vivo*-kultivierte Retina-Explantate verwendet, welche mit Inhibitoren für ATM und DNA-PK behandelt wurden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass H2AX in den ersten Minuten nach Bestrahlung überwiegend im Euchromatin (EC) aber zum Teil auch im fakultativen HC phosphoryliert wird. Erst mehrere Minuten nach Bestrahlung konnte auch im konstitutiven HC eine Phosphorylierung von H2AX beobachtet werden. Es stellte sich heraus, dass die innerhalb der ersten Minuten überwiegend im EC auftretende

Phosphorylierung von H2AX ATM-abhängig ist. Im weiteren Verlauf können sowohl ATM als auch DNA-PK die Phosphorylierung von H2AX durchführen. Dabei liefert diese Arbeit erstmals Hinweise darauf, dass die DNA-PK für die Phosphorylierung von H2AX im konstitutiven HC verantwortlich zu sein scheint.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Retina der Maus in dieser Arbeit als ein neues *in vivo*-Modell für die Reparatur strahleninduzierter DSBs etabliert wurde. Da die Retina ein im Gegensatz zum restlichen Gehirn einfach aufgebautes und schnell zugängliches Gewebemodell darstellt, kann diese in Zukunft zum besseren Verständnis für die Zelltyp-spezifischen Vorgänge nach Einwirkung ionisierender Strahlung im zentralen Nervensystem beitragen. Mit den Stäbchen-PRs als dominierendem Zelltyp bietet die Retina von Mäusen außerdem ein gutes Modellsystem für die Analyse der DSB-Reparatur im HC, sowie für die Untersuchung der Transportmechanismen von DSBs in verschiedenen Chromatin-Bereichen. Durch die Beobachtung, dass in den Stäbchen-PRs adulter WT-Mäuse ein Defekt in der Reparatur strahleninduzierter DSBs auftritt, konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die Chromatinorganisation auch bei Säugern *in vivo* eine entscheidende Rolle bei der DSB-Reparatur spielt.

DNA double-strand break (DSB) repair is a crucial process for the maintenance of genomic stability after exposure to ionizing radiation (IR) and other exogenous and endogenous factors. The cellular response to DSBs, including phosphorylation of histones (e.g. H2AX) and accumulation of signal proteins (e.g. pATM and 53BP1) at the break sites, depends on cell type-specific differences, with chromatin organization representing one important factor influencing DSB repair.

In this work, the DNA damage signaling as well as the DSB repair was analyzed after IR within the murine retina, as a simple organized tissue with a low number of cell types. Furthermore, rod photoreceptors (rods) as the predominant cell type of the murine retina exhibit a unique chromatin structure with a single central heterochromatin cluster which arises by fusion of several smaller clusters during postnatal development. Strikingly, rods of wildtype (wt)-mice exhibited a pronounced DSB repair defect after IR, detected by γ H2AX foci analysis and pulsed gel electrophoresis, which could neither be observed within other cells of the adult retina, brain or kidney, nor in still undifferentiated rod progenitors of postnatal mice (P4).

An analysis of the initial DNA damage signaling within the different retinal cell types revealed an inefficient accumulation of pATM and 53BP1 at the sides of DSBs within repair-impaired rods. Interestingly, this inefficient accumulation of pATM and 53BP1 could also be observed in repair-proficient cone-photoreceptors (cones) and bipolar cells, which exhibit a normal chromatin structure. However, despite the inefficient accumulation of pATM at the sides of DSBs in these cells, DNA-PK deficient mice (SCID-mice) show robust H2AX phosphorylation after IR in the whole retina. This confirms that pATM is present and functional in all cell types, since phosphorylation of H2AX can only be carried out by ATM or DNA-PK in resting neuronal cells. Additional irradiation experiments with ATM-deficient mice (AT-mice) show a prominent DSB repair defect comparable to that of rods in wt-mice. This is ascribed to unrepaired heterochromatic DSBs due to the missing phosphorylation of the heterochromatin building factor KAP1 by ATM and the subsequent lack of chromatin relaxation. Further analysis showed a comparable lack of KAP1 phosphorylation within wt rods after IR. In contrast, cones and bipolar cells, which both showed an inefficient accumulation of pATM at the sites of DSBs, but a normal DSB repair, exhibited robust KAP1 phosphorylation. Thus, the striking DSB repair defect within rods of adult mice closely correlates with the unique chromatin structure as well as the missing phosphorylation of KAP1.

Earlier work demonstrates that radiation induced DSBs can move within chromatin. For this reason the transport of IR-induced DSBs after heavy ion irradiation was investigated in rods of wt-mice. Thereby, a rapid transport of DSBs could be detected within few minutes after irradiation. Furthermore, the localization of IR-induced γ H2AX foci within chromatin of wt-rods was studied during repair. Thereby the contribution of ATM and DNA-PK to the phosphorylation of H2AX within the different chromatin compartments was analyzed. By using *in vivo* irradiation of WT-, AT- and SCID mice as well as ATM- or DNA-PK inhibitor treated retinal explants, a faster phosphorylation of H2AX within euchromatin and facultative heterochromatin was revealed, when compared to constitutive heterochromatin.

Furthermore, ATM was identified as the faster kinase, phosphorylating H2AX exclusively within the first few minutes after irradiation. At later time points ATM and DNA-PK both phosphorylate H2AX with the exception of the constitutive heterochromatin, where H2AX was nearly exclusively phosphorylated by DNA-PK.

To summarize, during this work the murine retina was established as a new model for the analysis of radiation-induced DSBs *in vivo*. Since this tissue represents a comparably simple organized part of the central nervous system that can be isolated very fast after IR, it might become a suitable model to gain better insights in the radiation response of different cell types of the brain. Furthermore, with highly heterochromatic rods as a predominant cell type, it offers a unique possibility to study the mechanisms of mammalian DSB repair within different compartments of chromatin, which was shown in this work for the first time to affect DSB repair *in vivo*.

2. EINLEITUNG

2.1. Physikalische Grundlagen ionisierender Strahlung

Die in den Zellen aller Lebewesen enthaltene DNA ist Träger der gesamten Erbinformation eines Organismus. Durch verschiedene Einflüsse werden in der DNA ständig Schädigungen hervorgerufen. Dabei führen nicht nur endogene natürliche Prozesse wie die Meiose, die V(D)J-Rekombination oder die bei Stoffwechselprozessen entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies zur DNA-Schädigung, sondern auch exogene Faktoren wie z.B. Chemikalien oder Strahlung. In der Strahlenbiologie wird die Auswirkung ionisierender Strahlung auf biologische Systeme untersucht, wobei nicht nur physikalische Prozesse sondern auch die biologischen Folgereaktionen betrachtet werden. Die Einwirkung ionisierender Strahlung auf biologisches Material führt zur Anregung oder Ionisation von Atomen oder Molekülen. Während bei einer Anregung ein Elektron eines Atoms oder Moleküls vorübergehend auf ein höheres Energieniveau angehoben wird, ist bei einer Ionisation ausreichend Strahlungsenergie vorhanden, um ein oder mehrere Elektronen aus einem Atom oder Molekül herauszuschlagen. Durch diese Veränderungen im Atom oder Molekül können Schädigungen von Proteinen oder der DNA in der Zelle hervorgerufen werden. Die ionisierende Strahlung lässt sich in die elektromagnetische Strahlung (Röntgen- und γ -Strahlung) und die Teilchenstrahlung (Elektronen, Neutronen, Protonen und Schwerionen) unterteilen.

2.1.1. Elektromagnetische Strahlung und ihre Wechselwirkung mit Materie

Die ionisierende elektromagnetische Strahlung wird abhängig von ihrer Wellenlänge und ihrer Herkunft in Röntgen- und γ -Strahlung unterteilt und wird der dünn ionisierenden Strahlung zugeordnet. Während γ -Strahlung beim Zerfall von Elementen entsteht, werden Röntgenstrahlen in einer Röntgenröhre erzeugt. In der Röntgenröhre werden Elektronen in einem elektrischen Feld auf hohe Energien beschleunigt und treffen anschließend auf eine Metallanode (z.B. Wolfram), wodurch diese stark abgebremst werden. Durch diesen Prozess entsteht sowohl Röntgen-Bremsstrahlung als auch charakteristische Röntgenstrahlung¹. Bei der Bremsstrahlung wird das beschleunigte Elektron im Coulombfeld des Anoden-Atomkerns abgebremst und gibt Energie ab bzw. emittiert elektromagnetische Strahlung. Wenn die beschleunigten Elektronen mit genügend hoher Energie auf absorbierendes Anoden-Material treffen, können Hüllelektronen aus der unteren Schale eines Atoms herausgeschlagen werden. Dieser freie Platz in der Atomschale kann von einem Elektron aus einer höheren Schale wieder besetzt werden, wobei die dadurch entstandene Energiedifferenz als charakteristische Röntgenstrahlung emittiert wird.

Die elektromagnetische Strahlung kann man sich als einen Strom von Photonen vorstellen. Wird elektromagnetische Strahlung von lebendem Material absorbiert, besitzt jedes Photon genügend Energie um Ionisationen hervorzurufen, wodurch es in Abhängigkeit von der Photonenenergie zu unterschiedlichen Wechselwirkungen mit der Materie kommen kann. Bei niedrigen Energien (< 50 keV) dominiert der Photoeffekt, bei dem das Photon mit einem Elektron aus der inneren Schale eines Atoms interagiert (Abbildung 1, A). Dabei gibt das Photon seine gesamte Energie an das Elektron ab, wobei ein Teil der Energie dafür benötigt wird, die Bindungsenergie zu überwinden. Das freigesetzte, als Sekundärelektron bezeichnete Elektron kann anschließend weitere Ionisationen durch Wechselwirkungen mit der Materie bewirken.

Bei hohen Energien (0,1 bis 1 MeV) tritt überwiegend der Compton-Effekt auf, bei dem das Photon mit freien Elektronen aus der äußeren Atomhülle wechselwirkt (Abbildung 1, B). Dabei gibt das Photon einen Teil seiner Energie an das Elektron ab. Daraufhin wird das Photon von seiner Bahn abgelenkt und kann mit niedrigerer Energie weitere Ionisationen bewirken. Auch das freigesetzte Sekundärelektron kann durch Wechselwirkung mit der Materie weitere Ionisationsprozesse verursachen. Ist die Energie der Photonen größer als 1,02 MeV kann der Paarbildungseffekt auftreten (Abbildung 1, C). Dabei entstehen aus dem Photon im elektrischen Feld des Atomkerns ein Elektron und ein Positron.

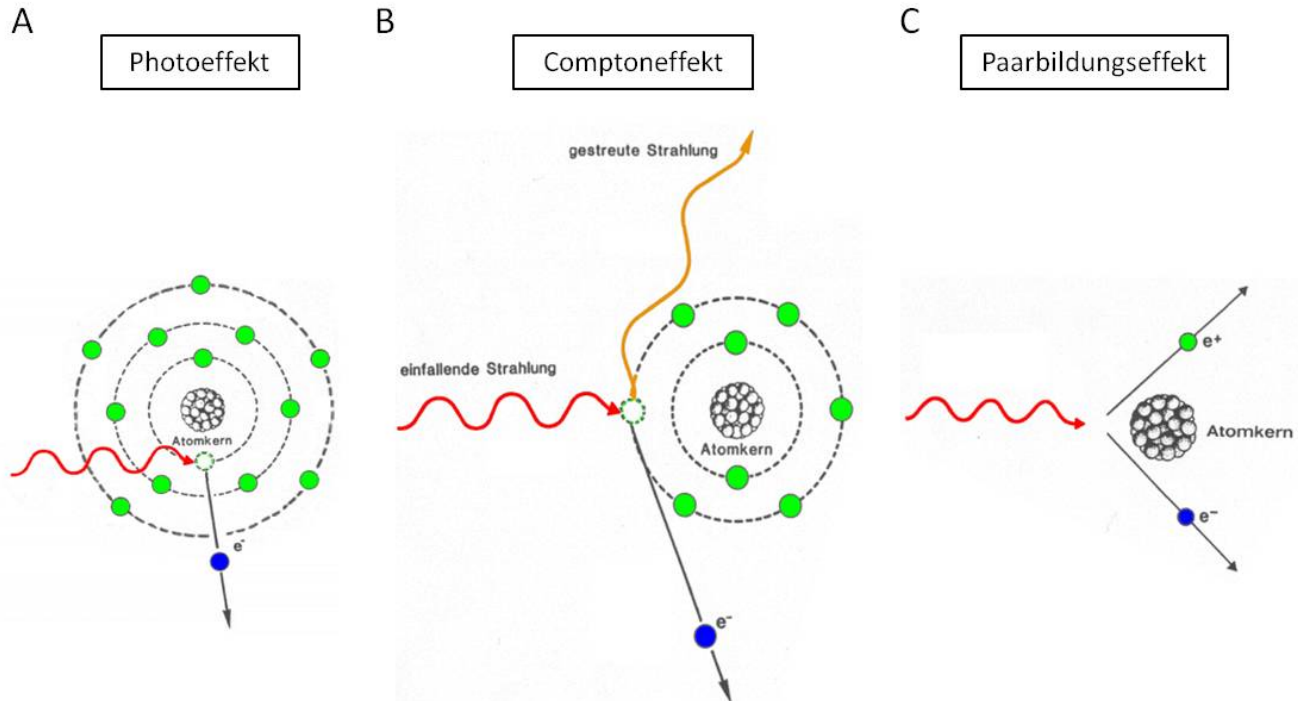


Abbildung 1: Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Materie. (A) Schematische Darstellung des Photoeffekts, bei dem ein Photon mit einem Elektron aus der inneren Schale eines Atoms wechselwirkt und seine gesamte Energie an dieses Elektron abgibt, wodurch ein freies Elektron entsteht. (B) Beim Comptoneffekt interagiert ein Photon mit einem freien Elektron aus der äußeren Atomhülle und gibt einen Teil seiner Energie an dieses Elektron ab. (C) Beim Paarbildungseffekt entstehen aus einem Photon im elektrischen Feld des Atomkerns ein Elektron und ein Positron. (Quelle: <http://web-docs.gsi.de/~wolle/TELEKOLLEG/ATOM/IMAGES/photoeffekt1.gif>; <http://mta-r.de/wp-content/uploads/2011/09/compton-effekt.gif>; <http://web-ocs.gsi.de/~wolle/TELEKOLLEG/ATOM/IMAGES/paarbildung.gif>; modifiziert).

Bei der elektromagnetischen Strahlung wird ein Großteil der Wechselwirkungen mit der Materie durch Sekundärelektronen verursacht ². Somit spielen die durch Sekundärelektronen ausgelösten Ionisationen eine wichtige Rolle bei der Beurteilung der Strahlenwirkung auf biologisches Material.

2.1.2. Schwerionenstrahlung und ihre Wechselwirkung mit Materie

Die Schwerionenstrahlung, die bei der Beschleunigung von Elementen wie z.B. Titan, Kohlenstoff oder Nickel in einem Teilchenbeschleuniger zustande kommen kann, wird der dicht ionisierenden Strahlung zugeordnet. Bei der Teilchenstrahlung wird die getroffene Materie direkt von dem geladenen Teilchen ionisiert. Abhängig von der Energie können die geladenen Teilchen die atomare Struktur der absorbierenden Materie schädigen und chemische sowie biologische Veränderungen bewirken. Schwerionen können aufgrund ihrer hohen Ladung leicht elektromagnetisch beschleunigt und somit für wissenschaftliche oder therapeutische Zwecke genutzt werden ³⁻⁵.

Die Ionenstrahlen erzeugen entlang ihrer Flugbahn eine dichte Spur von Ionisationsereignissen, welche überwiegend durch Coloumb-Kräfte hervorgerufen werden. Die Ionisationsereignisse sind dabei abhängig von der Energie des Primärteilchens. In Abbildung 2 werden die Ionisationsereignisse am Beispiel eines Kohlenstoffions bei unterschiedlichen Energien dargestellt ⁶. Dabei finden bei hoher Energie des Ions weniger Ionisationsereignisse pro Wegstrecke statt als bei niedriger Energie. Durch Wechselwirkung der Teilchen mit den Atomen der absorbierenden Materie werden δ -Elektronen, welche eine relativ geringe Reichweite im Vergleich zum Primärteilchen besitzen, aus der Atomhülle emittiert. Je höher die Energie des Primärteilchens ist, umso größer ist die Reichweite der herausgelösten δ -Elektronen. Die δ -Elektronen können ebenfalls mit Materie wechselwirken und Schädigungen hervorrufen.

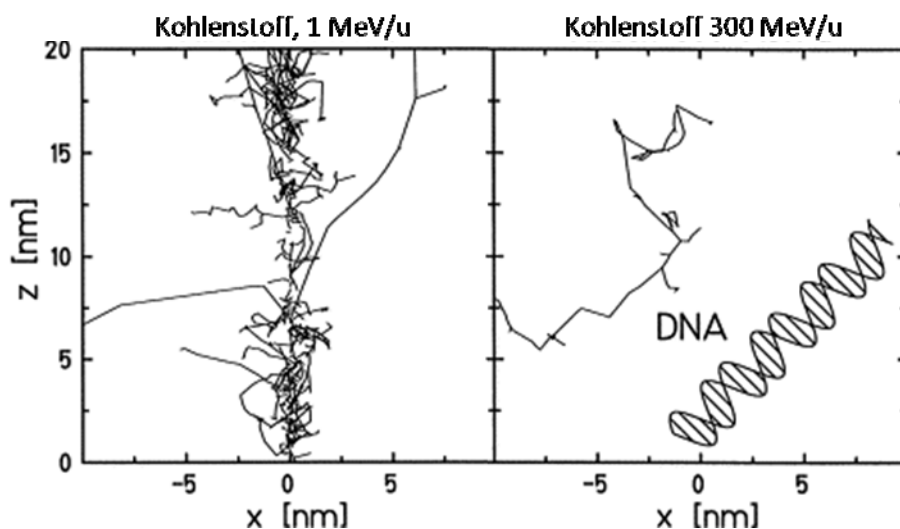


Abbildung 2: Darstellung der Ionisationsereignisse entlang einer Teilchenspur von Kohlenstoffionen mit unterschiedlichen Energien. Bei hoher Energie (300 MeV/u) finden weniger Ionisationsprozesse pro Wegstrecke statt als bei niedriger Energie (1 MeV/u). (Quelle: Kraft G., 2000⁷, modifiziert).

2.1.3. Linearer Energie Transfer und Relative Biologische Wirksamkeit

Die Energie ionisierender Strahlung wird entlang der Bahnspur des geladenen Teilchens oder der erzeugten Sekundärelektronen an das durchdrungene Material abgegeben. Dabei wird die Strahlung je nach Dichte der auftretenden Ionisationen in dünn oder dicht ionisierende Strahlung unterteilt. Um die Wirkung ionisierender Strahlung auf biologisches Material beschreiben zu können wurde der Begriff des linearen Energietransfers (LET) eingeführt. Der LET beschreibt wie viel Energie ein ionisierendes Teilchen pro Wegstrecke an das durchdrungene Material abgibt. Die Einheit des LET ist $\text{keV}/\mu\text{m}$.

Der LET ist bei dünn ionisierender Strahlung, zu der die Röntgen- und γ -Strahlung gehört, relativ klein. Die dicht ionisierende Teilchenstrahlung kann dagegen, abhängig von der Energie des Ions, zu einem hohen LET führen, da beim Durchtritt von Teilchen durch das Material tausende Ionisationen auftreten können. Je höher die Energie des Ions ist, umso niedriger ist dessen LET. Die Wirkung ionisierender Strahlung richtet sich auch nach deren Energie-Dosis, welche die absorbierte Energie pro Masse beschreibt und in der Einheit „Gray“ (Gy) angegeben wird.

Unterschiedliche Strahlenarten können bei gleicher Dosis verschiedene biologische Auswirkungen haben. Somit wird abhängig vom betrachteten Endpunkt bei 1 Gy α -Teilchen-Strahlung ein größerer Effekt erzeugt als nach 1 Gy Röntgenstrahlung^{1,8}. Um unterschiedliche Strahlenarten miteinander vergleichen zu können wurde der Begriff der Relativen Biologischen Wirksamkeit (RBW) eingeführt. Die RBW gibt das Verhältnis der absorbierten Dosis einer Referenzstrahlung (z.B. 250 kV Röntgenstrahlung) zur Dosis einer anderen Strahlung an, die zur Auslösung desselben Effekts notwendig ist. Dabei ist die RBW abhängig vom LET und der Art des erzeugten Schadens.

2.1.4. Direkte und indirekte Strahleneffekte im biologischen System

Die durch ionisierende Strahlung hervorgerufene mutagene oder lethale Wirkung ist auf die Schädigung der DNA zurückzuführen⁹. Dabei kann die ionisierende Strahlung die DNA direkt oder indirekt schädigen. Beim direkten Strahleneffekt kommt es zur Interaktion der Photonen oder deren Sekundärelektronen mit der DNA (Abbildung 3). In Folge von Ionisationen wird die DNA durch das Aufbrechen von kovalenten Bindungen geschädigt, wodurch es zu direkten chemischen Veränderung in der DNA Struktur kommt. Beim indirekten Strahleneffekt werden besonders H_2O -Moleküle, welche sich in der Nähe der DNA befinden, durch Photonen oder deren Sekundärelektronen ionisiert, wodurch freie Radikale erzeugt werden, welche wiederum die DNA schädigen können¹⁰. Während der direkte Strahleneffekt überwiegend bei dicht ionisierender Strahlung (Teilchenstrahlung) auftritt, kommt der indirekte Strahleneffekt meist bei dünn ionisierender Strahlung (Röntgen- oder γ -Strahlung) vor.

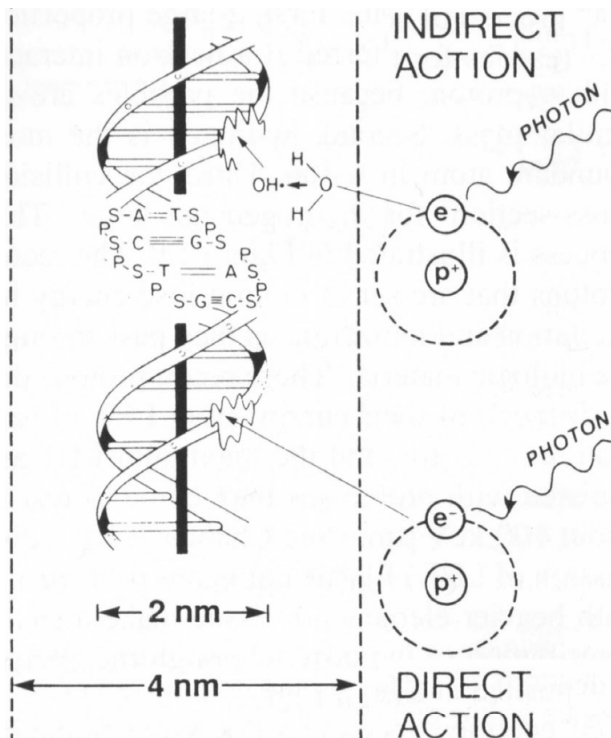
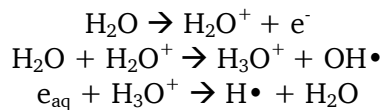


Abbildung 3: Direkte und indirekte Auswirkung ionisierender Strahlung auf die DNA. Beim direkten Strahleneffekt wirken Photonen oder deren Sekundärelektronen direkt auf die DNA ein. Beim indirekten Strahleneffekt interagieren Photonen oder deren Sekundärelektronen besonders mit H₂O-Molekülen, wodurch freie Radikale erzeugt werden, welche die DNA schädigen. Während der direkte Strahleneffekt überwiegend bei dicht ionisierender Strahlung auftritt, kommt der indirekte Strahleneffekt meist bei dünn ionisierender Strahlung vor. (S = Zucker; P = Phosphat; A = Adenin; C = Cytosin; G = Guanin; T = Thymin). (Quelle: Hall EJ., 2000¹⁰).

Als freies Radikal wird ein ungebundenes Atom oder Molekül bezeichnet, welches ungepaarte Elektronen besitzt und dadurch hoch reaktiv ist. Da die Zelle zu etwa 80 % aus Wasser besteht kommt es sehr häufig zu Interaktionen von Photonen bzw. Elektronen mit H₂O-Molekülen, wodurch diese ionisiert oder durch die Hydrolyse des Wassers gespalten werden können^{8,11}.



Dabei entstehen hoch reaktive Ionenradikale H₂O⁺, die ein ungepaartes Elektron besitzen und eine Halbwertszeit von 10⁻¹⁰ s haben. Diese können mit weiteren H₂O-Molekülen reagieren, wobei weitere reaktive Hydroxylradikale (OH•), sowie reduzierte Wasserstoff-Radikale (H•) erzeugt werden, welche ebenfalls eine Halbwertszeit von 10⁻¹⁰ s besitzen¹². Die entstanden Radikale, welche sich in unmittelbarer Nähe zur DNA befinden, erzeugen einen großen Anteil der DNA-Schäden nach ionisierender Strahlung^{1,8,13-16}.

2.1.5. Arten strahleninduzierter DNA-Schäden

Bei der Einwirkung ionisierender Strahlung auf die DNA kann es zu unterschiedlichen Arten strahleninduzierter DNA-Schädigungen kommen. So werden zum Beispiel durch direkte und indirekte Strahleneffekte nach 1 Gy Röntgenstrahlung durchschnittlich 800-1600 Zuckerschäden, 30 DNA-DNA-*cross links*, 150 Protein-DNA *cross links*, 1000-2000 Basenschäden (z.B. oxidierte Basen, alkylierte Basen, Basenfehlpaarungen, Basenverluste), 500-1000 DNA-Einzelstrangbrüche (ESBs) und 20 - 40 DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) pro Zelle erzeugt^{17,18}. Während einfache Schäden wie Basenschäden und ESBs sehr schnell über DNA-Reparaturmechanismen wie die Basen- und Nukleotidexzisionsreparatur repariert werden können und keinen Einfluss auf das Überleben der Zelle haben, kann die Erzeugung von nur einem DSBs zum Verlust der genomischen Integrität bis hin zum Zelltod führen^{11,19-22}. Daher ist es für die Zelle essentiell, effektive Reparaturmechanismen für DNA-DSBs zu besitzen^{8,17}.

2.2. Zelluläre Schadensantwort auf DNA-DSBs in eukaryotischen Zellen

Ein DNA-Doppelstrangbruch (DSB) entsteht, wenn bei beiden Einzelsträngen der DNA-Doppelhelix das Zucker-Phosphat-Rückgrat in einem Bereich von 10 Basenpaaren (bp) unterbrochen ist, sodass auf beiden Seiten Einzelstrangbrüche (ESBs) entstehen²³. DSBs können entweder exogen durch Einwirkung ionisierender Strahlung²⁴, Chemotherapeutika oder Chemikalien entstehen²⁵ oder endogen als Zwischenprodukte verschiedener Prozesse wie die des oxidativen Stoffwechsels, die der Meiose²⁶, die der V(D)J Rekombination^{27,28} oder die der Replikation¹⁹ gebildet werden (Abbildung 4). Nach Auftreten von DSBs erfolgt die Detektion des Schadens durch Sensormoleküle, welche den DNA-Schaden selbst erkennen oder auf Chromatinänderungen reagieren. Die Information des Schadens wird über sogenannte Transducer verstärkt und an Effektoren weitergegeben, welche dann die Antwort auf den Schaden in der entsprechenden Zelle bestimmen. So kann die Zelle auf einen DSB z.B. mit einem Zellzyklusarrest reagieren, um der Zelle Zeit zur DNA-Reparatur zu verschaffen. Sind die Schäden der DNA irreparabel, kann die Zelle z.B. durch Apoptosevorgänge den programmierten Zelltod einleiten, um die genomische Integrität des Organismus zu bewahren^{29,30}. Werden DSBs fehlerhaft repariert, kann dies zur Entstehung von Mutationen und chromosomalen Aberrationen führen^{31,32}, welche die chromosomale Stabilität gefährden und zur Krebsentstehung beitragen können^{33,34}.

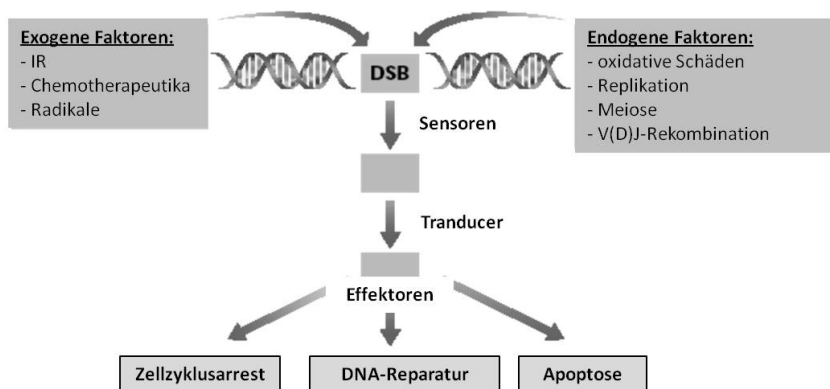


Abbildung 4: Zelluläre Schadensantwort auf endogen und exogen erzeugte DSBs. DSBs können durch exogene Faktoren (IR, Chemotherapeutika und Chemikalien) oder endogene Faktoren (oxidative Schäden, Replikation, Meiose und V(D)J-Rekombination) entstehen. Nach Auftreten eines DSBs wird das Schadenssignal von Sensor-Proteinen erkannt, über Transducer-Proteine verstärkt und an Effektor-Proteine weitergegeben, welche dann die Reaktion der Zelle einleiten (Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur oder Apoptose). (Quelle:Khanna K.K., 2001²⁹, modifiziert).

2.2.1. Erkennung von DNA-DSBs

Nach Auftreten eines DNA-DSBs wird in der Zelle die DSB-Signal-Kaskade in Gang gesetzt (Abbildung 5). Dabei wird zunächst der MRN-Komplex (Mre11 (*meiotic recombination 11 homolog*), Rad50 (*radiation sensitive 50*) und NBS1 (*Nijmegen Breakage Syndrome 1*)) zum DSB rekrutiert³⁵⁻³⁷. Die Serin-Threonin-Kinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), welche zur Gruppe der Phosphatidylinositol 3-Kinase-ähnlichen Proteinkinasen (PIKK) gehört und in der Zelle als inaktives Dimer vorliegt, wird ebenfalls zum DSBs rekrutiert. Dadurch kommt es zur Autophosphorylierung von ATM am Ser1981 (pATM) und zur Dissoziation des inaktiven Dimers in aktive Monomere³⁸⁻⁴⁰. Wie die Autophosphorylierung von ATM induziert wird ist noch unklar, jedoch konnte gezeigt werden, dass die veränderte Chromatinstruktur infolge eines DSBs dazu beitragen kann³⁸. Ebenso gibt es Hinweise darauf, dass ATM durch die Bindung an NBS1 aktiviert wird^{41,42}. Die Aktivierung von ATM führt mit Hilfe des MRN-Komplex zur Phosphorylierung von H2AX-Histonen am Ser139 (γ H2AX)^{43,44}. H2AX-Histone sind Varianten von H2A-Histonen und stellen etwa 10 - 20 % des gesamten H2A-Anteils in eukaryotischen Zellen dar. Auch andere Mitglieder der PIKK-Familie (ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*) und DNA-PKcs (*catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase*)) können die Phosphorylierung des H2AX-Histons am Ser139 bewirken⁴³. Im weiteren Verlauf der Signaltransduktion wird MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) zum Bruch rekrutiert, wo dieses an γ H2AX bindet^{45,46}. Die Bindung von NBS1 an das am H2AX gebundenen MDC1 hat die Rekrutierung weiterer ATM-Moleküle zur Folge. Durch diese Signalamplifikation werden etwa 2000

H2AX-Moleküle über einen Bereich von 2 Megabasenpaaren (Mbp) phosphoryliert, wodurch das Schadenssignal auch auf die den Schaden umgebende Chromatinregion übertragen wird^{47,48}. Es wird vermutet, dass die Veränderung der Chromatinstruktur an der Stelle des DNA-Schadens eine verbesserte Rekrutierung von DSB-Reparaturfaktoren zur Folge hat^{49,50}. Neben der Phosphorylierung von H2AX ist ATM ebenfalls in der Lage weitere Downstreamprodukte (p53, Chk1, Chk2) zu phosphorylieren, welche für den Zellzyklusarrest bzw. für die Einleitung der Apoptose von Bedeutung sind^{51,52}. Für die Aufrechterhaltung des Schadenssignals werden weitere Mediatorproteine an den Ort des Schadens gebracht. Durch die Phosphorylierung von MDC1 wird die E3 Ubiquitin-Ligase RNF8 (*RING-finger ubiquitin ligase 8*) zum Bruch rekrutiert, welche daraufhin H2AX-Histone ubiquitiniert^{53,54}. Dies hat die Bindung einer weiteren Ubiquitin-Ligase (RNF168=*RING-finger ubiquitin ligase 168*) zur Folge⁵⁵. RNF168 polyubiquitiniert weitere H2AX-Histone, wodurch es zur Rekrutierung des Mediatorproteins 53BP1 (*p53 binding protein 1*) kommt. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Polyubiquitinierung der Histone und der Rekrutierung von 53BP1 konnte noch nicht nachgewiesen werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Methylierungen von H3-Histonen (H3K79me) und H4-Histonen (H4K20me) eine wichtige Rolle bei der Bindung von 53BP1 am Chromatin spielen⁵⁶⁻⁵⁸. Durch die Phosphorylierung zahlreicher H2AX-Histone über weite Chromatinbereiche ist es möglich, mit Hilfe der Immunhistochemie, DSBs zu visualisieren. Dabei werden z.B. spezifische gegen γ H2AX-gerichtete Antikörper verwendet, die DSBs in Form von distinkten γ H2AX-Foci abbilden⁵⁹⁻⁶². Durch den Einsatz spezifischer Antikörper kann so die Akkumulation von verschiedenen Proteinen wie z.B. von phosphoryliertem ATM oder von 53BP1 an den DSB-Enden nachgewiesen werden⁶³⁻⁶⁵.

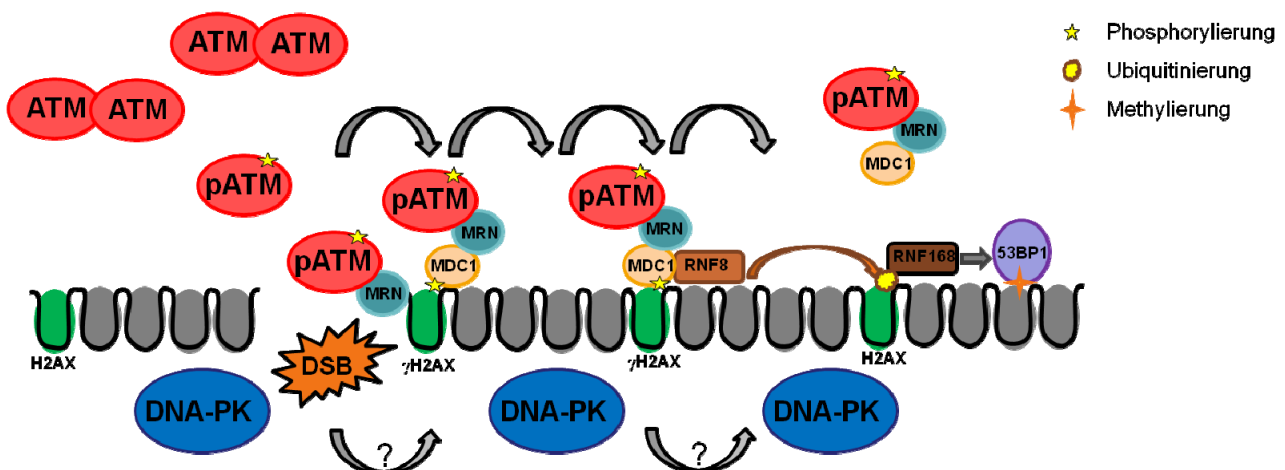


Abbildung 5: Darstellung der DSB-Signalkaskade. Nach Auftreten eines DSBs wird der MRN-Komplex (Mre11, Rad50, NBS1) zum DSB rekrutiert. Die Serin-Threonin-Kinase ATM liegt in der Zelle als inaktives Dimer vor und wird ebenfalls zum DSB rekrutiert, wobei diese durch Autophosphorylierung am Ser1981 in zwei aktive Monomere dissoziiert (= pATM). Die Aktivierung von ATM führt durch die Interaktion mit dem MRN-Komplex zur Phosphorylierung des Histons H2AX am Ser139 (= γ H2AX). Auch die DNA-Proteinkinase (DNA-PK) kann die Phosphorylierung des H2AX Histons am Ser139 bewirken. Im weiteren Verlauf der Signalkaskade wird MDC1 zum Bruch rekrutiert und an γ H2AX gebunden, worauf durch die Interaktion von MDC1 mit dem MRN-Komplex weitere pATM-Moleküle am Bruch akkumulieren. Durch diese Signalamplifikation werden H2AX-Histone über weite Bereiche phosphoryliert, wodurch das Schadenssignal auf die umgebende Chromatinregion übertragen wird. Zur Aufrechterhaltung des Schadenssignals werden weitere Mediatorproteine zum DSB rekrutiert. Durch die Phosphorylierung von MDC1 wird die Ubiquitinligase RNF8 zur Schadensstelle gebracht, welche H2AX-Histone ubiquitiniert. Durch die Ubiquitinierung von H2AX wird eine weitere Ubiquitinligase (RNF168) gebunden, welche weitere H2AX Histone ubiquitiniert, wodurch wiederum weitere Mediatorproteine wie z.B. 53BP1 rekrutiert werden. Anschließend kann 53BP1 durch die Methylierung von verschiedenen Histonen an das Chromatin gebunden werden.

2.2.2. Reparatur von DNA-DSBs

Die Reparatur von DNA-DSBs kann über zwei verschiedene Hauptreparaturmechanismen ablaufen: das Nicht-homologe Endjoining (NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR). Über welchen

Mechanismus ein DSB repariert wird ist abhängig von der Zellzyklusphase, der Struktur des Schadens und der Lokalisation innerhalb des Chromatins. Das NHEJ findet in allen Phasen des Zellzyklus statt, ist jedoch der Hauptreparaturmechanismus in der G₀/G₁-Phase (Abbildung 6). Die Reparatur von DSBs über HR tritt ausschließlich in der S- und G₂-Phase des Zellzyklus auf, da für diesen Mechanismus die Sequenzen der homologen Schwesterchromatide als Matrice zur Verfügung stehen müssen^{34,61,66-68}.

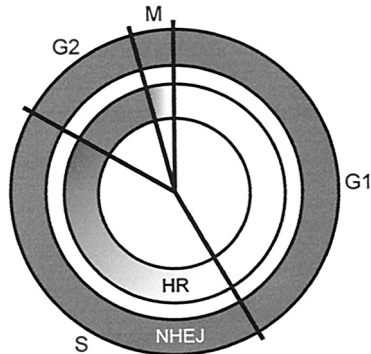


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Beteiligung von HR und NHEJ an der Reparatur von DSBs in verschiedenen Zellzyklusphasen. Das NHEJ kann in allen Phasen des Zellzyklus stattfinden, während die HR ausschließlich in der S- und G₂-Phase des Zellzyklus auftritt. (Quelle: Rothkamm K., 2003^{61,66,67}).

Beim NHEJ werden die Bruchenden eines DSBs miteinander verknüpft (Abbildung 7). Die wichtigsten Proteinkomplexe des NHEJ sind das Ku70/Ku80-Heterodimer, die DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*), sowie der XLF (*XRCC4-like factor*)/XRCC4 (*X-ray-complementing Chinese hamster gene 4*)/DNA-Ligase IV-Komplex^{69,70}. Nach Auftreten eines DSBs wird zunächst das Ku70/Ku80 Heterodimer an die Bruchenden rekrutiert und gebunden⁷¹. Darauf folgt die katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PKcs) an den DSB rekrutiert^{72,73}. Die DNA-PK gehört, ebenso wie ATM und ATR, zur Familie der Phosphatidylinositol 3-Kinase-ähnlichen Proteinkinasen (PIKK). Durch die Interaktion von DNA-PKcs mit Ku70/80 wird die DNA-PKcs an das Bruchende gebunden und autophosphoryliert. Sowohl die Bindung von Ku70/Ku80 als auch von DNA-PKcs schützen die gebrochene DNA vor Degradation durch Nukleasen und bewirken eine Stabilisierung der beiden Bruchenden, wobei diese in räumlicher Nähe zueinander gehalten werden⁷⁴⁻⁷⁶. Durch die Autophosphorylierung von DNA-PK kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch der XLF/XRCC4/DNA-Ligase IV-Komplex zum DSBs rekrutiert wird, der für die Ligation der Bruchenden verantwortlich ist^{72,77}. Befinden sich noch zusätzliche Läsionen an den Bruchenden (z.B. 3'-Phosphate oder 3'-Phosphoglycolate) müssen die Enden des DSBs vor der Ligation erst mit Hilfe von DNA-Polymerasen oder Nukleasen (z.B. Artemis) prozessiert werden^{72,78-80}, wodurch es zu Deletionen, Insertionen oder Basenpaarsubstitutionen von einigen bp oder kbp kommen kann⁸¹.

Die HR ist im Gegensatz zum NHEJ ein fehlerfreier Reparaturmechanismus. Dabei werden homologe Schwesterchromatiden als Template für die beschädigten Chromatiden verwendet (Abbildung 7). Nach Auftreten eines DSBs wird der MRN-Komplex an das Bruchende rekrutiert und gebunden, um die Bruchenden in räumlicher Nähe zueinander zu halten⁸². Das durch ATM aktivierte Protein CtIP (*CtBP interacting protein*) interagiert mit dem MRN-Komplex, was die Resektion der Bruchenden zur Folge hat⁸³. Weitere Resektionsvorgänge werden durch die Exonukleasen Exo1 (*Exonuclease 1*) und BLM (*Bloom*) durchgeführt⁸⁴⁻⁸⁶. Das Protein RPA (*Replication protein A*) lagert sich an die resektierten, einzelsträngigen DNA-Abschnitte an und verhindert dort den Abbau resektierter Bruchenden durch Nukleasen oder die Ausbildung von Sekundärstrukturen^{87,88}. Mit Hilfe von BRCA2 (*Breast cancer 2*) wird die Rekombinase Rad51 auf die einzelsträngigen DNA-Bereiche geladen, wobei RPA verdrängt wird⁸⁸⁻⁹⁰. Durch diese Beladung entsteht ein Nukleoprotein-Filament, welches sich auf die Suche nach homologen DNA-Sequenzen begibt. Nachdem homologe Sequenzen identifiziert wurden, invasiert das einzelsträngige Nukleoprotein-Filament in den Doppelstrang der Schwesterchromatide, welcher als Template für die Neusynthese des geschädigten DNA-Abschnitts verwendet wird. Die resektierten Bruchenden werden durch DNA-Polymerasen neu synthetisiert und durch Ligasen miteinander verknüpft. Die bei der Stranginvasion entstandenen Holliday Junctions werden nach der Ligation der Bruchenden durch Resolvasen, Nukleasen (Mus81) und Helikasen (BLM) aufgelöst⁹¹⁻⁹³.

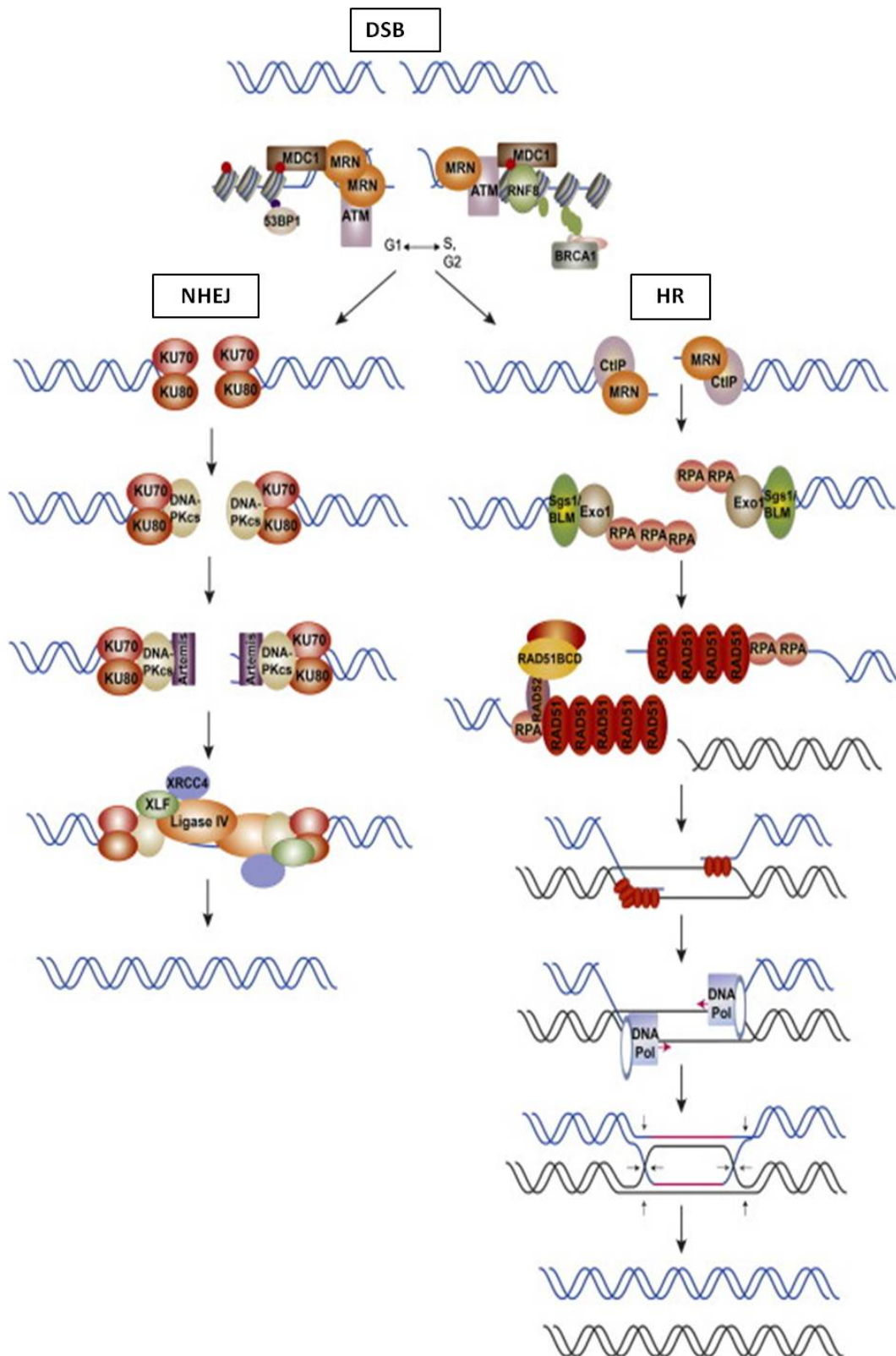


Abbildung 7: Mechanismen zur Reparatur von DSBs: Homologe Rekombination (HR) und Nicht-homologes Endjoining (NHEJ). Nach der Erkennung von DSBs und Einleitung der Schadensantwort werden DSBs, abhängig vom Zellzyklus und der Resektion der Bruchenden, entweder über NHEJ oder HR repariert. Beim NHEJ wird zunächst das Ku70/Ku80-Heterodimer an die Bruchenden rekrutiert und gebunden. Daraufhin folgt die Rekrutierung der katalytischen Untereinheit der DNA-PK (DNA-PKcs), welche mit Ku70/80 interagiert und folglich ebenfalls an das Bruchende gebunden wird. Durch Nukleasen (wie z.B. Artemis) werden die stabilisierten Bruchenden prozessiert und anschließend mit Hilfe des rekrutierten XLF/XRCC4/DNA-LigaseIV-Komplex ligiert. Bei der HR wird zunächst der MRN-Komplex an das Bruchende rekrutiert und gebunden. CtIP

interagiert mit dem MRN-Komplex und leitet die Resektion der Bruchenden ein. Weitere Resektionsvorgänge werden durch die Exonukleasen Exo1 und BLM durchgeführt. Das Protein RPA lagert sich folglich an die resektierten, einzelsträngigen DNA-Abschnitte an. RPA wird durch die Beladung dieser Abschnitte mit Rad51 verdrängt. Durch die Beladung der einzelsträngigen DNA-Abschnitte mit Rad51 entsteht ein Nukleoprotein-Filament, welches sich auf die Suche nach homologen DNA-Sequenzen begibt. Nachdem homologe Sequenzen identifiziert wurden, invasiert das einzelsträngige Nukleoprotein-Filament in den Doppelstrang der als Template dienenden Schwesterchromatide. Die resektierten Bruchenden werden durch DNA-Polymerasen neu synthetisiert und durch Ligasen miteinander verknüpft. Die bei der Stranginvasion entstandenen Holliday Junctions werden nach der Ligation der Bruchenden aufgelöst. (Quelle: Gospodinov A. & Herceg Z., 2003⁹⁴, modifiziert).

2.2.3. Chromatindynamik in der DSB-Reparatur

Die DNA liegt im Zellkern von eukaryotischen Zellen in kompakten, hoch organisierten Chromatinstrukturen vor. Diese Strukturen kommen durch die Verpackung der DNA mit Hilfe von Nukleosomen zustande. Ein Nukleosom ist ein Oktamer aus acht Histonproteinen, welches sich aus je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 zusammensetzt. Die DNA ist 1,65-mal um ein solches Nukleosom gewunden, was einer Länge von 146 Basenpaaren entspricht. DNA die nicht mit Nukleosomen interagiert wird als *Linker*-DNA bezeichnet. Das Histon H1 bindet an dieser *Linker*-DNA zwischen den Nukleosomen und spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Verpackung der DNA⁹⁵ (Abbildung 8).

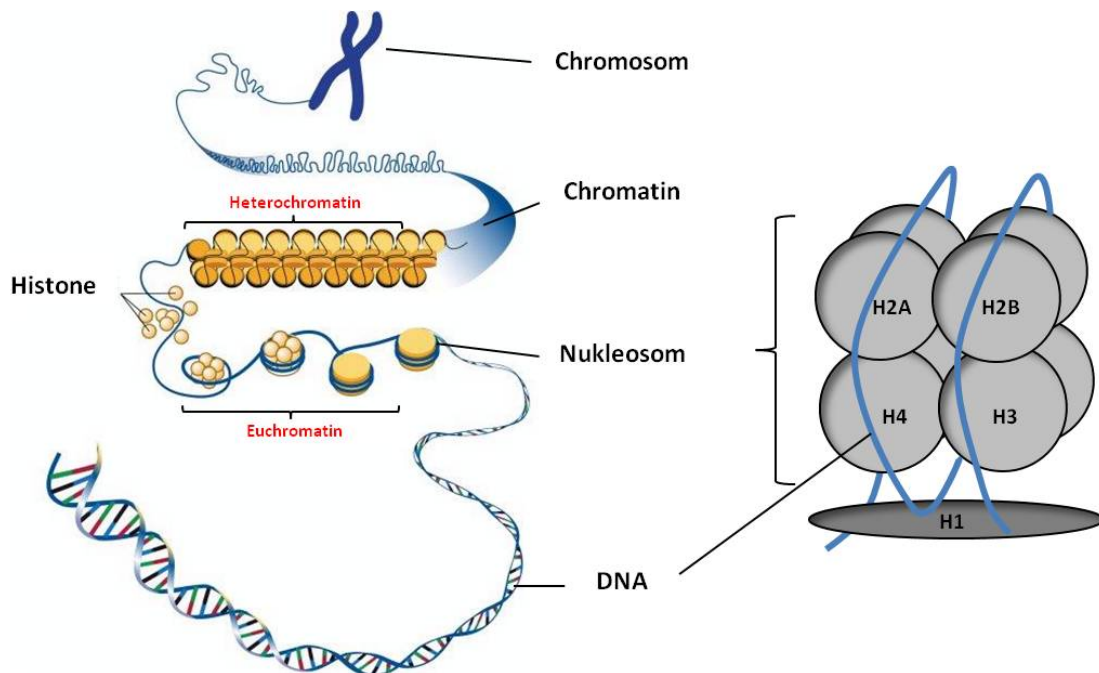


Abbildung 8: Aufbau des Chromatins eukaryotischer Zellen. Die DNA eines Chromosoms wird mit Hilfe von Nukleosomen in hoch organisierte Chromatinstrukturen (Euchromatin/Heterochromatin) verpackt. Ein Nukleosom ist ein Oktamer aus acht Histonproteinen, welches sich aus je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 zusammensetzt. Die DNA, welche nicht mit Nukleosomen interagiert, wird als *Linker*-DNA bezeichnet. Das Histon H1 bindet an dieser *Linker*-DNA zwischen den Nukleosomen und spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Verpackung der DNA. (Quelle: Darryl Leja/National Human Genome Research Institute, modifiziert).

Da die DNA für die Replikation, die Rekombination oder die Reparatur zugänglich sein muss, ist die Verpackung der DNA in bestimmte Chromatinstrukturen ein reversibler Prozess. Das Chromatin wird entsprechend seinem Kondensationsgrad in das Euchromatin (EC) und das Heterochromatin (HC) unterteilt. Das EC stellt die weniger kondensierten, transkriptionsaktiven Chromatinbereiche dar, während sich das HC aus stark kondensierten, inaktivierten Bereichen zusammensetzt. Dabei wird das HC in das fakultative und das konstitutive HC unterteilt. Das fakultative HC besteht aus kodierenden DNA-Abschnitten, welche jedoch inaktiviert wurden. Durch eine Aktivierung kann das fakultative HC

in EC übergehen. Das konstitutive HC besteht dagegen aus Chromosomenabschnitten, welche nicht kodierende DNA-Abschnitte mit hochrepetitiven Sequenzen (Satelliten-DNA) enthalten. Diese Satelliten-DNA befindet sich in den Centromeren und Telomeren von Chromosomen und ist in der Lage, sich selbst zu falten, wodurch eine sehr kompakte Struktur ausgebildet wird. Das konstitutive HC ist stabil und somit nicht aktivierbar. Während das konstitutive HC meist im Zentrum des Zellkerns lokalisiert ist (auch zentrales HC), befindet sich das fakultative HC oft im Bereich der Kernmembran (auch peripheres HC)⁹⁶⁻⁹⁸. Die Aktivierung bzw. Inaktivierung und somit auch der Kondensationsgrad des Chromatins wird durch die Modifikation von Histonproteinen bestimmt. In euchromatischen Bereichen sind spezielle Histon-Modifikationen wie z. B. bestimmte Methylierungen (H3K4me3) oder Acetylierungen (H3K9ac) zu finden, während in heterochromatischen Bereichen andere Formen von Acetylierungen (H3K4ac) oder Methylierungen (H3K9me3, H4K20me3) auftreten⁹⁹⁻¹⁰². Durch die Methylierung von H3K9 wird eine Bindestelle für das Protein HP1 erzeugt, welches ebenfalls an der Ausbildung kompakter Chromatinstrukturen im HC beteiligt ist¹⁰³.

Nach Auftreten eines DSBs werden im ganzen Zellkern Mechanismen in Gang gesetzt, welche durch lokale Modifikationen zu einer Veränderung in der Chromatinstruktur führen, die den DSB umgibt^{48,103-106}. Diese Veränderung kommt zum einem durch die Modifikation von Histonen (Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung, Methylierung und Acetylierung) zustande, wobei z.B. die Phosphorylierung von H2AX am Ser139 (γ H2AX) an der Einleitung der Schadensantwort als auch an der Übertragung des Schadenssignals an umgebende Chromatinbereiche beteiligt ist. Zum anderen wird die Chromatinstruktur durch den aktiven Umbau mittels ATP-abhängiger Chromatin-Remodulierer-Komplexe verändert. Diese nutzen die Hydrolyse von ATP, um Nukleosomen innerhalb des Chromatins umzustrukturieren, zu bewegen oder zu verdrängen¹⁰⁷. Die nach Auftreten eines DSBs aktivierten Mechanismen führen somit zu einer lokalen Relaxation des Chromatins, wodurch die Reparatur von DSBs unterstützt wird.

Die Reparatur strahleninduzierter DSBs weist in allen Phasen des Zellzyklus ein biphasisches Verhalten auf, das sich in eine schnelle und eine langsame Komponente unterteilen lässt^{108,109} (Abbildung 9). Der größte Anteil an DSBs (~ 85 %) wird dabei innerhalb der ersten ~ 4 h über die schnelle Komponente repariert. Die Reparatur der restlichen ~ 15 % der DSBs erfolgt dagegen innerhalb von ~ 1-3 Tagen über die langsame ATM-abhängige Komponente. In der G0/G1-Phase erfolgt sowohl die schnelle als auch die langsame Reparatur über NHEJ. In der G2-Phase werden DSBs der schnellen Komponente über NHEJ repariert, während die Reparatur von DSBs der langsamen Komponente über HR abläuft¹⁰⁹.

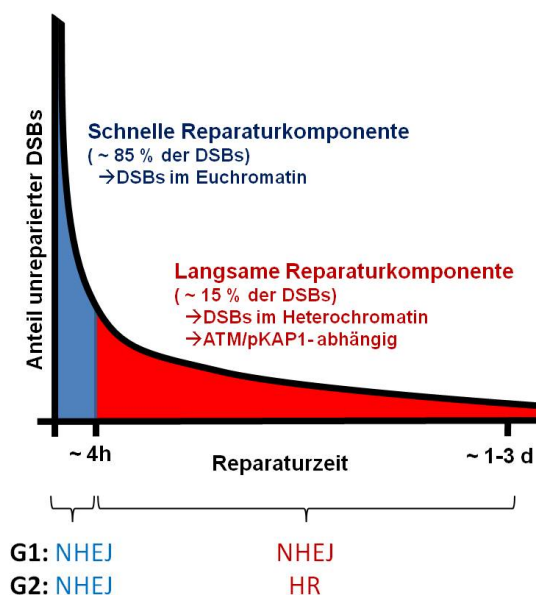


Abbildung 9: Biphasisches Verhalten der Reparatur von DSBs. In allen Zellzyklusphasen weisen strahleninduzierte DSBs ein biphasisches Verhalten der Reparatur auf. Etwa 85 % der DSBs werden innerhalb der ersten 4 h über eine schnelle Komponente repariert, während die restlichen etwa 15 % der DSBs innerhalb von 1-3 Tagen über eine langsame ATM-abhängige Komponente repariert werden. In der G0/G1-Phase werden alle DSBs über NHEJ repariert. In der G2-Phase werden DSBs der schnellen Komponente über NHEJ repariert, während die Reparatur von DSBs der langsamen Komponente über HR abläuft. (Quelle: Goodarzi A.A., 2010¹⁰⁹, modifiziert).

Der Grund für die Existenz einer schnellen bzw. langsamen Reparaturkomponente liegt in der Lokalisation des DSBs innerhalb unterschiedlicher Chromatinbereiche: Euchromatische Brüche werden unabhängig von ATM über die schnelle, heterochromatische Brüche dagegen über die langsame ATM-abhängige Komponente repariert^{109,110}. Die Rolle von ATM bei der Reparatur heterochromatischer DSBs besteht dabei in der Phosphorylierung von KAP1 (*Krüppel-associated protein 1*). KAP1 ist eine Komponente des HCs und wird in der Literatur als Corepressor für Krüppel-assoziierte Box- Zinkfinger-Proteine (KRAB-ZFPs) beschrieben¹¹¹. Diese KRAB-ZFPs sind sequenzspezifische transkriptionelle Repressoren, welche mit Hilfe ihres Zink-Fingers an die DNA binden können. Durch die Interaktion von KAP1 mit der KRAB-Domäne der ZFPs bewirkt KAP1 die Ansammlung von HC-bildenden Faktoren wie z.B. HP1 (*Heterochromatin protein 1*), HDACs (*Histon deacetylases*) und ATP-abhängigen Chromatin-Remodulierern, was zur dichten Packung des Chromatins und somit zur Ausbildung heterochromatischer Strukturen führt^{109,112}. Die Phosphorylierung von KAP1 bewirkt dessen Inaktivierung, was zu einer lokalen Öffnung des HCs am Schadensort führt und somit die Reparatur von DSBs in heterochromatischen DNA-Bereichen unterstützt, indem geschädigte DNA-Bereiche für Reparaturfaktoren besser zugänglich gemacht werden^{113,114}. Das Protein 53BP1, welches durch verschiedene Ubiquitinierungsvorgänge am Histon H2AX zum DSB rekrutiert wird, bindet an modifizierte H3/H4 Histone (siehe Kapitel 2.2.1.) und interagiert mit ATM. Durch diese Interaktion kann ATM am DSB akkumulieren, um die Phosphorylierung von KAP1 und somit die Öffnung des HCs zu gewährleisten¹¹⁵. Im Zuge der Relaxation des HCs konnte auch eine Dissoziation des Proteins HP1 (*Heterochromatin protein 1*) von betroffenen HC-Domänen nach Bestrahlung beobachtet werden¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Aus den Veränderungen der Chromatinstruktur im Bereich von DSBs kann eine damit verbundene Mobilität von Chromatin-Domänen, sowie der darin enthaltenen DSBs resultieren. DSB-enthaltende Chromatin-Domänen können eine Mobilität über einen Bereich von mehreren μm hinweg aufweisen. Die Mobilität von DSBs wurde nach Bestrahlung von Zellen mit α -Strahlung mit unterschiedlichem LET¹¹⁹, niedrig energetischer Röntgenstrahlung¹²⁰ sowie nach Bestrahlung mit Laser¹²¹ untersucht. Durch die verschiedenen Strahlenqualitäten kommt es zu einer unterschiedlichen Verteilung von DSBs, welche zu Schadensclustern oder einfachen DSBs führen können. Während eine lokale Bestrahlung mit einem hohen LET (α -Partikel) zur Induktion einer Vielzahl an DSBs in räumlicher Nähe führt, werden nach Bestrahlung mit einem niedrigen LET (Röntgenstrahlung) lediglich einfache DSBs erzeugt. Es wurde gezeigt, dass DSBs nach Bestrahlung mit niedrigem LET in einer relativ stabilen Position verbleiben, während bei DSBs nach Bestrahlung mit hohem LET eine Mobilität aufweisen, welche zur Bildung von sogenannten Reparaturclustern führt¹¹⁹. Im Gegensatz dazu wurde nach Bestrahlung von Zellen mit dicht ionisierenden Schwerionenstrahlung keine signifikante Mobilität von DSBs beobachtet¹²². Weitere Untersuchungen zur Mobilität von DSBs zeigten, dass diese sowohl vom Kondensationsgrad der DNA im Bereich des DSBs als auch von der Zellzyklusphase abhängen kann. Nach Bestrahlung heterochromatischer Bereiche muriner Zellen mit einzelnen Ionen wurde zu sehr frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung gezeigt, dass die im HC erzeugten DSBs innerhalb kürzester Zeit mit Hilfe bislang nicht vollständig aufgeklärter Mechanismen aus dem HC heraus an die Grenze zum EC verlagert und anschließend über die langsame Reparaturkomponente ATM-abhängig repariert werden^{109,123-125}. Des Weiteren zeigen DSBs in der S-Phase des Zellzyklus, in welcher das Chromatin in dekontensierter Form vorliegt, ebenfalls eine geringere Mobilität im Vergleich zu DSBs in der G1- oder G2-Phase¹²⁶. Die Mobilität von DSBs kann ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung von chromosomalen Translokationen spielen, welche für die Krebsentstehung relevant sind^{127,128}. Chromosomale Translokationen entstehen, wenn sich während der Reparatur DSB-Enden fehlerhaft miteinander verknüpfen. Die Wahrscheinlichkeit, dass chromosomale Translokationen entstehen ist umso höher, desto mehr DSBs sich in räumlicher Nähe zueinander befinden bzw. desto größer die Mobilität dieser DSBs ist¹²⁹.

2.3. Einfluss von Laminen auf die Chromatinorganisation und DNA-Schadensantwort

Das Netzwerk der Kernlamina besteht vorwiegend aus den A-Typ und B-Typ Laminen. Die A-Typ Lamine (überwiegend Lamin A und C) sind unterschiedliche Splice-Varianten des LMNA-Gens und werden gewebespezifisch exprimiert. Die Gene LMNB1 und LMNB2 kodieren für die B-Typ Lamine. Mit Hilfe von integralen Transmembranproteinen (z.B. des Lamin B-Rezeptors-LBR) wird die Kernlamina in der Kernmembran verankert. Die Lamine sind multifunktionale Proteine und spielen nicht nur bei der Chromatinorganisation, sondern auch bei der Gen-Expression, DNA-Transkription und DNA-Reparatur eine bedeutende Rolle¹³⁰⁻¹³².

Durch Mutationen in den Genen, welche für Lamin oder Lamin-assoziierte Proteine kodieren, können verschiedene Erbkrankheiten entstehen, die als Laminopathien zusammengefasst werden und in engem Zusammenhang mit vielfältigen Krankheits-Phänotypen degenerativer Störungen wie z.B. muskulären Dystrophien, Neuropathien und frühzeitigen Alters-Syndromen (Hutchinson Gilford Progeria Syndrom=HGPS) stehen¹³³⁻¹³⁵. Viele dieser Erbkrankheiten beruhen auf Mutationen von A-Typ Laminen. Zur Untersuchung der Funktion von A-Typ Laminen existieren zahlreiche Studien bei denen humane Zellen oder Maus-Modelle mit Mutationen im Lmna-Gen zum Einsatz kommen. In diesen Studien werden z.B. die Veränderungen in der Zellkernmorphologie und der Organisation des Heterochromatins, sowie Defekte in der DNA-Schadensantwort und Reparatur beschrieben^{134,136-139}.

Es wurde gezeigt, dass Zellen mit Mutationen im Lmna-Gen eine veränderte Kernstruktur und einen Verlust des peripheren Heterochromatins aufweisen¹⁴⁰. In HGPS-Fibroblasten wurden veränderte Eigenschaften des konstitutiven HCs beobachtet, die durch eine verminderte Trimethylierung von H3K9 (H3K9me3) und eine erhöhte Trimethylierung von H4K20 (H4K20me3) gekennzeichnet sind. Ebenso wurden Veränderungen des fakultativen HCs festgestellt, welche sich durch eine verminderte Trimethylierung von H3K27 (H3K27me3) auszeichnen^{141,142}. In Studien mit Lmna-/- MEFs wurde hingegen eine Reduktion von H4K20me3 beobachtet, während im H3K9me3-Level keine Unterschiede festgestellt werden konnten¹⁴³. Des Weiteren wird in HGPS-Zellen eine veränderte Laminastruktur durch das während der posttranslationalen Modifikation entstehende trunkierte Lamin A (Progerin) hervorgerufen, welches sich in der Kernperipherie anlagert^{141,144-147}.

Bei Untersuchungen von Faktoren die an der DNA-Schadensantwort beteiligt sind wurden hinsichtlich der zellulären Level von z.B. H2AX, MDC1, ATM, DNA-PK, Mre11, Nbs1 und Ku70 keine Unterschiede zwischen WT-Zellen und Zellen mit Mutationen im Lmna-Gen festgestellt¹⁴³. Lediglich für 53BP1 wurde ein verminderter zellulärer Level in Lmna -/- MEFs gezeigt, welcher durch das erneute Einbringen von Lamina A und C wieder auf ein normales Level zurückkehrt. Im Gegensatz dazu wurde bei anderen Mutanten (HGPS) eine erhöhte Anzahl an 53BP1 positiven Zellen beobachtet¹³⁶.

Im Hinblick auf die Integrität der DNA, weisen Zellen mit Mutationen im Lmna-Gen, im Vergleich zu WT-Zellen oft einen generell höheren DNA-Schadenslevel auf. So wurde ein erhöhter zellulärer γ H2AX Level, sowie ein erhöhter γ H2AX- und pATM-Foci Level nachgewiesen^{136,139,143,148}.

Des Weiteren zeigen mutierte Zellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber DNA schädigenden Agenzen oder ionisierender Strahlung. Diese wirkt sich negativ auf das Überleben von mutierten Zellen bzw. Mäusen aus und wird auf einen Defekt in der Reparatur von erzeugten DSB zurückgeführt¹³⁶. Im Vergleich zum WT werden in Zellen mit mutiertem Lmna-Gen nach Bestrahlung durchschnittlich etwa gleich viele γ H2AX-Foci induziert. Die Anzahl an γ H2AX-Foci, die mit 53BP1-Foci kolokalisiert, ist jedoch deutlich geringer und deutet auf eine unvollständige Rekrutierung des Reparaturfaktors hin. Erst zu späteren Zeiten nach Bestrahlung ist eine vollständige Rekrutierung von 53BP1 zu den durch γ H2AX markierten DSBs zu beobachten^{136,149}. Auch für die an der DSB Reparatur beteiligten Faktoren NBS1 und Mre11 wurde eine verzögerte Rekrutierung zu DSBs gezeigt¹³⁹.

Die Mutation des Lmna-Gen führt weiterhin zur Beeinträchtigung der Reparatur von DNA-Schäden. So weisen mutierte Zellen zu späteren Zeiten nach Bestrahlung noch zahlreiche γ H2AX/53BP1- Foci auf, welche verbleibende DSBs repräsentieren.^{136,139,148,149}

In der Literatur wird diskutiert in wie weit das generell höhere Schadenslevel bzw. der auftretende Reparaturdefekt in den Lmna-Mutanten mit der verzögerten Rekrutierung von Reparaturfaktoren in Zusammenhang steht. Es wird darüber spekuliert, ob A-Typ Lamine selbst eine direkte Funktion bei

der Rekrutierung von Reparaturfaktoren besitzen, in dem diese z. B. zwischen Kernmembran und Kernplasma migrieren und dabei verschiedenen Funktionen erfüllen¹⁵⁰.

2.4. Charakterisierung verwendeter Mausstämmе

Da Mäuse zu den Säugetieren gehören und im Vergleich zum Menschen ähnliche Eigenschaften in den Reparaturmechanismen aufweisen, sind diese Tiere ein gutes Modellsystem zur Untersuchung der Reparatur von DNA-Schäden. Ein weiterer Vorteil ist die Existenz von *Knockout*-Mäusen, bei denen bestimmte Gene, welche für die DNA-Reparatur von Bedeutung sind, manipuliert bzw. inaktiviert wurden. Mit Hilfe von Mausmodellen können die Auswirkungen von Defekten in wichtigen Komponenten der DNA-Reparatur untersucht und Rückschlüsse auf deren Beteiligung bei der Reparatur gezogen werden. In dieser Arbeit wurden neben Wildtyp-Mäusen (C57BL/6) folgende Mausstämmе für Untersuchungen verwendet:

SCID-Mäuse:

Bei dem schweren kombinierten Immundefekt (*severe combined immunodeficiency* = SCID) existiert eine spontane Mutation im *Prkdc*-Gen, welches sich beim Menschen auf Chromosom 8^{151,152} und bei der Maus auf Chromosom 16 befindet¹⁵³. Das *Prkdc*-Gen kodiert die katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PKcs). Die Mutation des *Prkdc*-Gens führt zu einer Deletion von 83 Carboxy-terminalen Aminosäuren des DNA-PKcs-Proteins¹⁵⁴.

Diese seltene autosomal rezessiv vererbte Erkrankung macht sich beim Menschen bereits im frühen Kindesalter durch eine schwere Störung des Immunsystems und einem damit verbundenen Entwicklungsrückstand bemerkbar, welcher durch die eingeschränkte Ausreifung der B- und T-Lymphozyten während der V(D)J-Rekombination zustande kommt.

In Mäusen wurde der SCID-Defekt erstmals 1983 beschrieben. Der menschliche Phänotyp dieses Defekts wurde bereits um 1950 charakterisiert^{155,156}. SCID-Mäusen zeigen eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit, da nach Bestrahlung eine Ausbildung von Tumoren in den T-Lymphozyten zu beobachten ist¹⁵⁷. Des Weiteren zeigen SCID-Mäuse nach Bestrahlung einen Defekt in der Reparatur von DSBs, da die DNA-PKcs eine wichtige Komponente für die Reparatur von DSBs über NHEJ ist¹⁵⁸⁻¹⁶⁰.

AT-Mäuse:

Bei der seltenen autosomal rezessiv vererbten Erkrankung *Ataxia telangiectasia* (AT) ist das ATM-Gen mutiert, welches sich beim Menschen auf Chromosom 11 befindet¹⁶¹ und für die Serin-Threonin-Kinase ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) kodiert^{39,162}.

Die Erkrankung tritt bereits im frühen Entwicklungsstadium von Kindern auf und ist gekennzeichnet durch zerebellären Ataxien (Gang- und Standunsicherheit), Störung der Augenbewegung, Entwicklungsrückstand, neuronale Degeneration, Teleangiectasien (Erweiterungen von Aterien), Defekte in der T-Lymphozyten-Reifung, sowie eine erhöhte Krebsprädisposition. Ebenfalls weisen AT-Patienten eine 3-4 fach höhere Strahlenempfindlichkeit auf^{163,164}. Der ATM-Defekt bei Mäusen äußert sich mit einer ähnlichen Symptomatik¹⁶⁵⁻¹⁶⁷.

Bei den AT-Mäusen wurde das ATM-Gen durch Einführung eines Vektors, welcher ein Neo-Resistenzgen enthält, so verändert, dass eine Mutation an der Stelle herbeigeführt wird, welche auch bei Menschen mit AT auftritt (*Data sheet: 129S6/SvEvTac-Atm^{tm1Awb}/J mice from The Jackson Laboratory*).

Die Kinase ATM spielt eine bedeutende Rolle in der DNA-Schadensantwort. So konnte bei Untersuchungen zur DSB-Reparatur gezeigt werden, dass nach Bestrahlung von AT-Zellen ein Teil der DSBs nach langen Reparaturzeiten nicht repariert werden^{168,169}. Das Vorhandensein von unreparierten DSBs in AT-Zellen wurde auf einen Defekt der Reparatur komplexer oder heterochromatischer DSBs zurückgeführt^{79,110}. Des Weiteren sind in AT-Zellen fehlerhafte Zellzyklus-Checkpoints^{170,171}, ein verändertes Auftreten von Apoptosen¹⁷², sowie eine erhöhte Anzahl an Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung¹⁷³ zu beobachten.

2.5. Die Mausretina als Modellsystem zur Untersuchung der DSB-Reparatur in verschiedenen Chromatin-Bereichen

2.5.1. Entwicklung und Aufbau der Mausretina

Die Mausretina ist ein Teil des Gehirns, welcher sich aus sieben Haupt-Zelltypen zusammensetzt und somit eine weniger komplexe Struktur aufweist als das Gehirn. Wegen der exponierten Lage des Auges ist die Mausretina ein schnell zugängliches und leicht zu isolierendes Gewebe. Die sich entwickelnde Retina stellt ein ausgezeichnetes Modellsystem dar, um entwicklungsbiologische Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Schichtenbildung und Entstehung neuronaler Netzwerke, sowie Apoptose zu untersuchen. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der *ex vivo*-Kultivierung der Retina als dreidimensionales Gewebe. Dies erlaubt eine Manipulation des Gewebes, indem dem Kultivierungsmedium z.B. Inhibitoren zugesetzt werden können. Aufgrund dieser Eigenschaften können mit Hilfe der Mausretina die Ursachen retinaler Erkrankungen erforscht werden.

Während der Embryonalentwicklung stülpen sich bilateral aus dem anterioren Neuralrohr (Diencephalon) optische Vesikel aus^{174,175}. Diese optischen Vesikel stoßen an das Ektoderm an und induzieren so die Einschnürung der Linsenplakode. Durch eine Invagination des optischen Vesikels bilden sich aus dem außen gelegenen Teil das retinale Pigmentepithel (RPE), während sich aus dem eingestülpten Teil die neuroblastische Retina ausbildet. Bei der Invagination des optischen Vesikels wird aus dem Ektoderm die Augenlinse abgeschnürt, welche sich dann im entstandenen Augenbecher befindet.

Die sich entwickelnde embryonale Retina besteht zunächst aus einer einzigen neuroblastischen Schicht (NBL=*neuroblastic layer*) (Abbildung 10). Während der Entwicklung trennt sich die Ganglienzellschicht (GCL=*Ganglien cell layer*) von der NBL ab. Dies geschieht durch die Ausbildung von Dendriten der Ganglienzellen, sowie der darauf folgenden Ausbildung von Fortsätzen der Amakrinzellen, wodurch eine zellfreie innere plexiforme Schicht (IPL=*inner plexiform layer*) entsteht¹⁷⁶. Im weiteren Entwicklungsverlauf teilt sich die verbliebene NBL in eine äußere nukleäre Schicht (ONL=*outer nuclear layer*) und eine innere nukleäre Schicht (INL=*inner nuclear layer*) auf, wodurch die Retina im adulten Zustand aus drei verschiedenen Zellkernschichten besteht¹⁷⁷. Auch diese Aufteilung der NBL entsteht durch die Ausbildung von Zellfortsätzen, bei der eine äußere plexiforme Schicht (OPL=*outer plexiform layer*) entsteht. In den plexiformen Schichten verschalten sich im Laufe der Entwicklung verschiedene Zelltypen miteinander, wodurch eine Kommunikation und Signalweiterleitung ermöglicht wird.

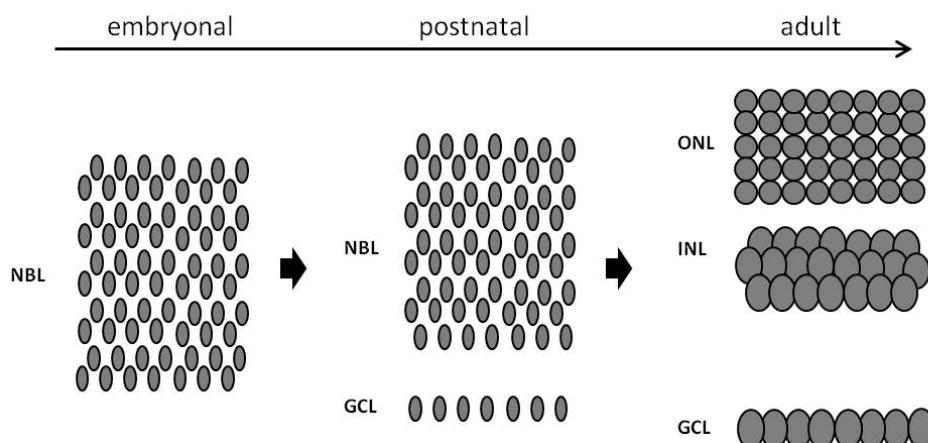


Abbildung 10: Ausbildung der Zellkernschichten der Mausretina im Laufe der Entwicklung. Im embryonalen Stadium besteht die Retina aus einer einzigen neuroblastischen Schicht (NBL=*neuroblastic layer*). Im Laufe der Entwicklung trennt sich die Ganglienzellschicht (GCL=*ganglien cell layer*) von der NBL ab. Im weiteren Entwicklungsverlauf trennt sich die verbliebene NBL in eine äußere nukleäre Schicht (ONL=*outer nuclear layer*) und eine innere nukleäre Schicht (INL=*inner nuclear layer*) auf, wodurch die adulte Retina aus drei verschiedenen Zellkernschichten besteht.

Parallel zu der Schichtenbildung laufen in der Retina verschiedene Prozesse ab. Durch Proliferations- und Differenzierungsvorgänge bilden sich aus multipotenten retinalen Vorläuferzellen die sieben Haupt-Zelltypen der adulten Retina aus¹⁷⁷⁻¹⁸⁰ (Abbildung 11). Dabei existiert eine chronologische Abfolge, zu welcher Zeit die unterschiedlichen Zelltypen determiniert werden. Als erster Zelltyp der Retina werden die Ganglienzellen generiert. Es folgt die Entstehung von Horizontalzellen, Zapfen-Photorezeptoren und Amakrinzellen. Im weiteren Entwicklungsverlauf entstehen die Stäbchen-Photorezeptoren, die Müller-Gliazellen und die Bipolarzellen.

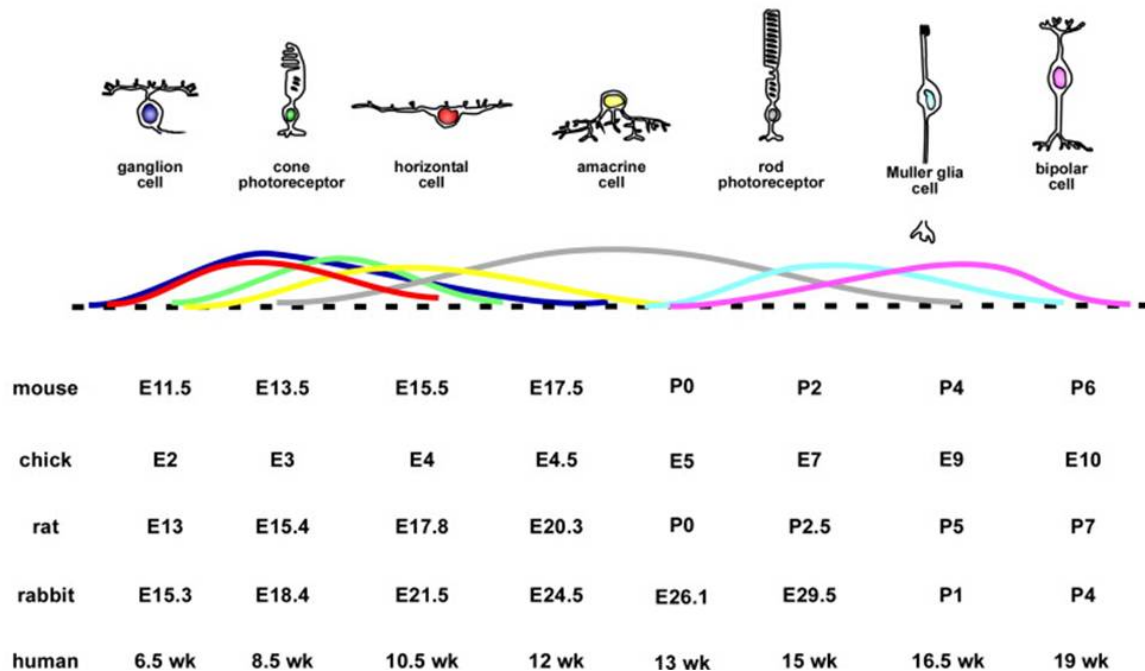


Abbildung 11: Darstellung der chronologischen Abfolge der Neurogenese verschiedener Retina-Zelltypen während der Entwicklung. Im Laufe der Entwicklung bilden sich aus multipotenten retinalen Vorläuferzellen die sieben Haupt-Zelltypen der Retina aus. Als erster Zelltyp werden die Ganglienzellen generiert. Es folgt die Entstehung von Horizontalzellen, Zapfen-Photorezeptoren und Amakrinzellen. Im weiteren Entwicklungsverlauf entstehen die Stäbchen-Photorezeptoren, die Müller-Gliazellen und die Bipolarzellen. Der zeitliche Ablauf der Neurogenese von verschiedenen Zelltypen ist abhängig von der Spezies. (Quelle: Martins R.A.P. & Pearson R. A., 2008¹⁷⁷).

In der adulten Retina haben sich alle differenzierten Zelltypen auf die drei entstandenen Zellkernschichten aufgeteilt, wodurch sich folgender Aufbau der Retina ergibt (Abbildung 12):

Die auf der lichtabgewandten Seite liegenden Photorezeptoren (PRs) grenzen mit ihren äußeren Segmenten (OSs=*outer segments*) an das retinale Pigmentepithel (RPE) an. Auf diese OSs folgen die inneren Segmente (ISs=*inner segments*) der PRs, welche mit ihren Zellkernen die äußere nukleäre Schicht (ONL=*outer nuclear layer*) bilden. Es existieren zwei verschiedenen Arten von PRs: die Stäbchen-PRs und die Zapfen-PRs. In der äußeren plexiformen Schicht (OPL=*outer plexiform layer*) verschalten sich die Fortsätze der PRs über synaptische Verbindungen mit den Dendriten der Bipolar- und Horizontalzellen. Die Zellkörper der Bipolar-, Horizontal-, Amakrin- und Müller-Gliazellen bilden die innere nukleäre Schicht (INL=*inner nuclear layer*). In der inneren plexiformen Schicht (IPL=*inner plexiform layer*) bilden die Fortsätze der Amakrin- und Bipolarzellen synaptische Verbindungen mit den Dendriten der Ganglienzellen aus. Die Zellkörper der Ganglienzellen befinden sich in der Ganglienzellschicht (GCL=*ganglion cell layer*). Die Axone der Ganglienzellen bündeln sich unterhalb der GCL und bilden den optischen Nerv, welcher mit dem optischen Tectum im Gehirn verbunden ist und die Informationen der Retina an dieses weiterleitet.

Mit Ausnahme der Müller-Gliazellen sind alle Zellen der Retina neuronale Zellen, welche an der Reizweiterleitung beteiligt sind. Die Müller-Gliazellen sind die Stützzellen der Retina. Diese durchziehen mit ihren Fortsätzen die gesamte Retina und bilden überhalb der Zellkerne der PRs eine

äußere limitierende Membran (OLM=*outer limiting membrane*) und unterhalb der Ganglienzellschicht eine innere limitierende Membran (*inner limiting membrane*) aus.

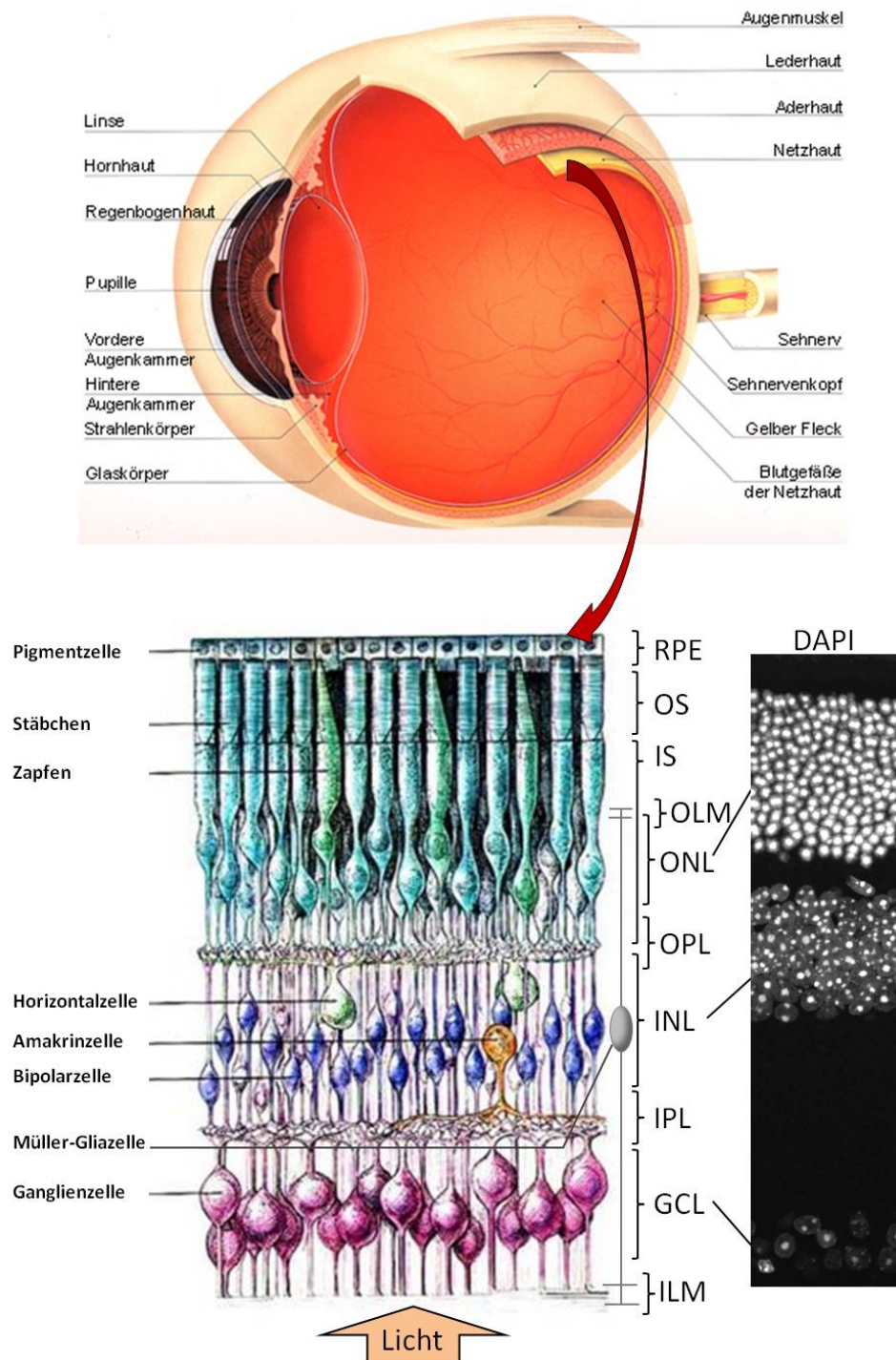


Abbildung 12: Aufbau der adulten Retina. In der adulten Retina grenzen die auf der lichtabgewandten Seite liegenden Photorezeptoren (PRs) mit ihren äußeren Segmenten (OSs=*outer segments*) an das retinale Pigmentepithel (RPE) an. Auf diese OSs folgen die inneren Segmente (ISs=*inner segments*) der PRs, welche mit ihren Zellkernen die äußere nukleäre Schicht (ONL=*outer nuclear layer*) bilden. Es existieren zwei verschiedenen Arten von PRs: die Stäbchen und die Zapfen. In der äußeren plexiformen Schicht (OPL=*outer plexiform layer*) verschalten sich die Fortsätze der PR über synaptische Verbindungen mit den Dendriten der Bipolar- und Horizontalzellen. Die Zellkörper der Bipolar-, Horizontal-, Amakrin- und Müller-Gliazellen bilden die innere nukleäre Schicht (INL= *inner nuclear layer*). In der inneren plexiformen Schicht (IPL=*inner plexiform layer*) bilden die Fortsätze der Amakrin- und Bipolarzellen synaptische Verbindungen mit den Dendriten der Ganglienzellen aus. Die Zellkörper der Ganglienzellen befinden sich in der Ganglienzellschicht (GCL=*ganglien cell layer*). Die Müller-Gliazellen

durchziehen mit ihren Fortsätzen die gesamte Retina und bilden überhalb der Zellkerne der PRs eine äußere limitierende Membran (OLM=outer limiting membran) und unterhalb der Ganglienzellschicht eine innere limitierende Membran (ILM=inner limiting membran) aus. (Quelle: <http://www.augenteam.de/images/auge2.jpg>; <http://genepath.med.harvard.edu/~cepko/Lab%20Intro/lab%20intro%20feb.htm>, modifiziert).

2.5.2. Die Photorezeptoren

Die Photorezeptoren (PRs) sind für die Umwandlung von Licht in elektrochemische Signale verantwortlich. Es gibt zwei Arten von PRs in der Säuger-Retina: die Stäbchen-PRs und die Zapfen-PRs (Abbildung 13). Die Stäbchen sind sehr lichtempfindlich und können einzelne Lichtquanten detektieren. Diese Zellen sind für das Hell-Dunkelsehen zuständig, welches besonders in der Nacht und bei Dämmerlicht benötigt wird. Die Zapfen sind weniger lichtempfindlich und sind für das Farbsehen verantwortlich, welches besonders am Tag benötigt wird ¹⁸¹. Die Zapfen können abhängig von ihrer Empfindlichkeit für unterschiedliche Wellenlängen in unterschiedliche Zapfentypen unterteilt werden. Das Verhältnis von Stäbchen und Zapfen in der Retina ist abhängig von der Spezies. Bei der Maus macht der Anteil an Zapfen lediglich ~ 3 % aus ¹⁸².

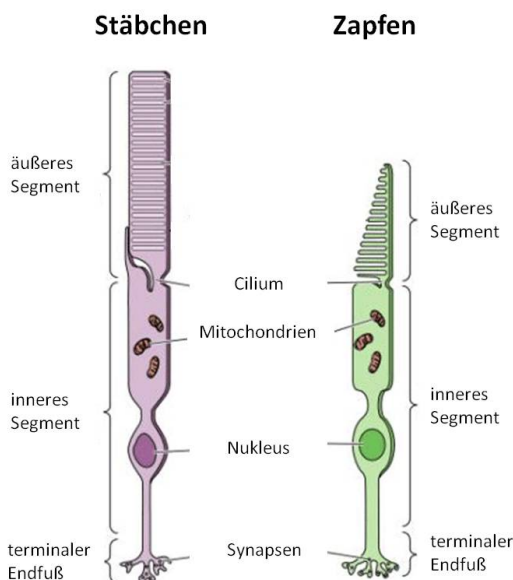


Abbildung 13: Morphologie von Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren. Die Zellkörper der Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) gliedern sich in ein äußeres Segment, ein inneres Segment und einen terminalen Endfuß. Im äußeren Segment der Stäbchen ist der Sehfärbstoff Rhodopsin in den optischen Discs eingelagert. Im äußeren Segment der Zapfen, welches im Vergleich zum äußeren Segment der Stäbchen kürzer ist, ist der Sehfärbstoff Opsin eingelagert. Die Zellorganellen der Photorezeptoren sind im inneren Segment lokalisiert. Am terminalen Endfuß befinden sich Synapsen, welche die neuronalen Informationen an nachgeschaltete Zellen weiterleiten.

(Quelle: <http://users.bergen.org/dondew/bio/AnP/AnP1/AnP1Tri2/FIGS/TRANS/figure3.gif>, modifiziert).

Die PRs weisen eine charakteristische Morphologie auf, wobei die Zellkörper in ein äußeres und ein inneres Segment (OS/IS) unterteilt werden (Abbildung 13). Im äußeren Segment ist bei den Stäbchen-PRs der Sehfärbstoff Rhodopsin in den optischen Discs eingelagert, bei den Zapfen-PRs der Sehfärbstoff Opsin. Diese Sehfärbstoffe lösen bei der Detektion eines Photons eine Kaskade von biochemischen Reaktionen aus, welche im Folgenden für die Reizleitung ausschlaggebend sind. Im inneren Segment sind die Zellorganellen, sowie der Zellkern lokalisiert. Am terminalen Endfuß der PRs befinden sich Synapsen, welche durch die Verbindung mit Synapsen der nachgeschalteten Zellen für die Informationsweiterleitung zuständig sind.

2.5.3. Chromatinstruktur von Stäbchen-Photorezeptoren der Mausretina

In allen Zellkernen von murinen Zellen ist der größte Teil des Heterochromatins (HCs) in der Interphase in Chromocentern lokalisiert ¹⁸³. Diese Chromocenter setzen sich aus dem perizentrischen HC von mehreren verschiedenen akrozentrischen Chromosomen zusammen. Die Anzahl an Chromosomen die an der Ausbildung der Cluster beteiligt ist, sowie deren Lokalisation innerhalb des Zellkerns ist abhängig vom Zelltyp ^{184,185}. Das perizentrische, konstitutive HC der Chromocenter ist bevorzugt an der Kernmembran oder an den Nucleoli lokalisiert (Abbildung 14, A). An das konstitutive HC grenzt das fakultative HC, während das Euchromatin (EC) zwischen dem perinukleären und dem

perinucleolären HC verteilt ist. Nach Anfärben von Zellkernen der Maus mit einem Farbstoff (DAPI), können die Chromocenter auf Grund ihrer konzentrierten Heterochromatinstruktur mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden.

Eine Besonderheit in der Chromatinorganisation zeigen die Stäbchen-PRs der adulten Mausretina. In diesen Zellen ist das perizentrische, konstitutive HC ausschließlich im Zentrum des Zellkerns in einem einzigen Chromocenter lokalisiert^{182,184} (Abbildung 14, B). Das fakultative HC ist um das zentrale Chromocenter herum organisiert, während das EC in der Peripherie des Zellkerns dicht im Bereich der Kernhülle platziert ist. Diese invertierte Chromatinstruktur beruht auf der fehlenden Expression der beiden Laminvarianten A und C, sowie des Lamin B-Rezeptors¹⁸⁶ und bildet sich in den Stäbchen-PRs erst im Laufe der postnatalen Entwicklung aus. Während kurz nach der Geburt (P0=postnatal 0) in den Zellkernen noch mehrere Chromocenter vorhanden sind, fusionieren diese im Laufe der Entwicklung und bilden im adulten Stadium ein einziges zentral im Zellkern lokalisiertes Chromocenter, welches etwa 60 % des Gesamtvolumens des Zellkerns einnimmt (Abbildung 15)¹⁸⁷ (Abbildung 15). Auf Grund dieser einzigartigen invertierten Chromatinstruktur stellen die Stäbchen-PRs der adulten Mausretina ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Reparatur und Mobilität von DSBs in unterschiedlichen Chromatin-Bereichen dar.

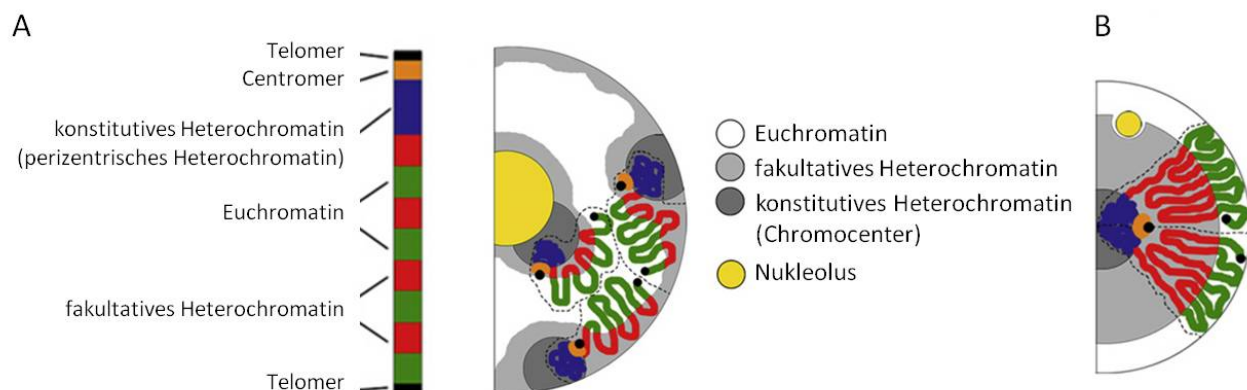


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Verteilung von Chromosomen-Subregionen im murinen Zellkern. (A) Im Zellkern von murinen Zellen ist das konstitutive Heterochromatin (HC) in der Interphase in mehreren Chromocentern organisiert. Diese Chromocenter setzen sich aus perizentrischen HC-Regionen von mehreren akrozentrischen Chromosomen zusammen. Das perizentrische, konstitutive HC der Chromocenter ist bevorzugt an der Kernmembran oder an den Nucloli lokalisiert. An das konstitutive HC grenzt das fakultative HC, während das Euchromatin (EC) zwischen dem perinukleären und dem perinucleolären HC verteilt ist. (B) In den Stäbchen-Photorezeptoren der Mausretina ist das perizentrische, konstitutive HC ausschließlich im Zentrum des Zellkerns in einem einzigen Chromocenter lokalisiert. Das fakultative HC ist um das zentrale Chromocenter herum organisiert, während das EC in der Peripherie des Zellkerns dicht im Bereich der Kernhülle platziert ist. (Quelle: Solovei I., 2009¹⁸⁴, modifiziert).

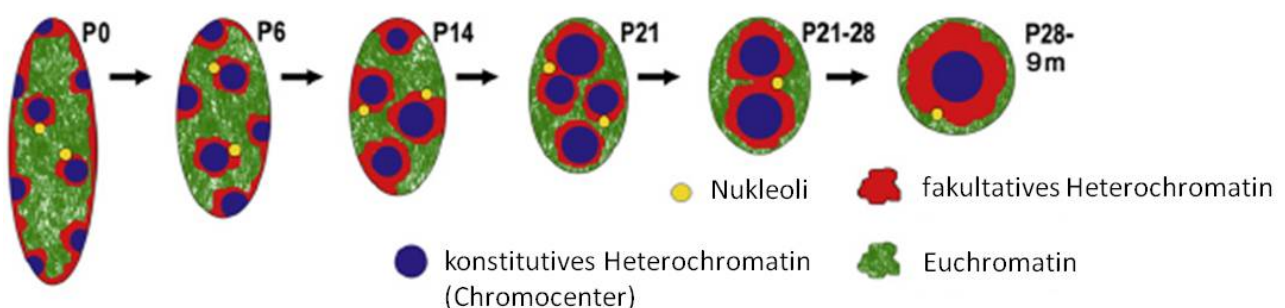


Abbildung 15: Postnatale Entwicklung von Stäbchen-Photorezeptoren in der Mausretina. In den Zellkernen der Stäbchen-Photorezeptoren liegt das konstitutive Heterochromatin kurz nach der Geburt (P0= postnatal 0) noch in mehreren Chromocentern vor. Diese fusionieren im Laufe der Entwicklung und bilden im adulten Stadium ein einziges zentral im Zellkern lokalisiertes Chromocenter. (Quelle: Solovei I., 2009¹⁸⁴, modifiziert).

2.5. Zielsetzung

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) stellen eine schwerwiegende Bedrohung für die genomische Integrität eines Organismus dar. Aus diesem Grund widmen sich zahlreiche Studien den Mechanismen zur Erkennung und Reparatur von DSBs. Im Rahmen von *in vitro*-Experimenten konnten bisher umfangreiche Kenntnisse über die unterschiedlichen Mechanismen der Erkennung und Reparatur von DSBs in verschiedenen Zelllinien von Säugern gewonnen werden. Dabei zeigt sich, dass diese Mechanismen unter anderem abhängig vom Zelltyp, von der Zellzyklusphase oder vom Chromatinstatus variieren. Im Vergleich dazu liegen für die Untersuchung der DSB-Schadensantwort relativ wenige *in vivo*-Studien vor.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die Schadenserkennung und Reparatur strahleninduzierter DSBs *in vivo* in Abhängigkeit des Chromatinstatus zu charakterisieren. Dazu sollte zunächst die Retina der Maus, welche ein vergleichsweise einfach strukturiertes Gewebe mit einer begrenzten Anzahl an Zelltypen mit unterschiedlichen Chromatinstrukturen darstellt, als neues *in vivo*-Modell etabliert werden. Um einen Einblick in den Ablauf der initialen DNA-Schadensantwort in diesem System zu erhalten, sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Schadenserkennung in den verschiedenen Zelltypen der Retina adulter WT-Mäuse charakterisiert werden. Diese Untersuchung sollte mit Hilfe der γ H2AX-Foci-Analyse durchgeführt werden, welche einen sensitiven Nachweis einzelner DSBs ermöglicht. Ebenso sollte die Akkumulation weiterer Signalproteine wie pATM und 53BP1 an strahleninduzierte DSBs betrachtet werden. Um Kenntnisse über die Rolle des Chromatinstatus bei der DSB-Reparatur in den verschiedenen Zelltypen der Retina zu gewinnen, sollte die Reparatur über mehrere Tage hinweg untersucht und mit anderen Geweben der Maus (Niere, Gehirn) verglichen werden. Ein besonderer Schwerpunkt sollte dabei auf die Analyse der Stäbchen-Photorezeptoren (PRs) gelegt werden. Diese weisen bei adulten Mäusen eine besondere Chromatinstruktur auf, bei der das Heterochromatin in einem einzigen zentral gelegenen Chromocenter vorliegt, um das sich das Euchromatin anordnet. Da diese einzigartige Chromatinstruktur der Stäbchen-PRs adulter WT-Mäusen erst im Laufe der Entwicklung entsteht, sollte des Weiteren die Schadensantwort von nicht ausdifferenzierten Vorläuferzellen der Stäbchen-PRs postnataler Mäuse im Entwicklungsstadium P4 betrachtet und mit der Schadensantwort adulter WT-Mäusen verglichen werden.

Da das Chromatin durch Chromatinmodifikationen eine dynamische Struktur darstellt, ist eine zentrale Frage der aktuellen Forschung, inwieweit DSBs aus Chromatinbereichen transportiert werden können, welche für Reparaturproteine schlecht zugänglich sind. Aufgrund der einzigartigen Chromatinorganisation der Stäbchen-PRs adulter WT-Mäuse wurde vermutet, dass sich dieser Zelltyp besonders gut für die Analyse solcher Transportvorgänge eignet. Daher sollte in den Stäbchen-PRs zunächst die Bewegung von DSBs nach Bestrahlung mit Schwerionen untersucht werden. Die anschließende Analyse der Lokalisation strahleninduzierter γ H2AX-Foci innerhalb verschiedener Chromatinbereiche nach Röntgenbestrahlung sollte weitere Rückschlüsse auf mögliche Transportvorgänge von DSBs zulassen. Anhand ATM-defizienter AT- Mäuse und DNA-PK-defizienter SCID-Mäuse sollte des Weiteren die Beteiligung der Kinasen ATM und DNA-PK an der Phosphorylierung von H2AX in unterschiedlichen Chromatinbereichen analysiert werden. Da es bereits kurz nach Bestrahlung zur Phosphorylierung von H2AX kommt, sollten zusätzlich zu den *in vivo*-Versuchen *ex vivo*-kultivierte Retina-Explantate zum Einsatz kommen. Diese Art der Kultivierung ermöglicht sowohl eine Fixierung des Gewebes zu kürzeren Zeitpunkten nach Bestrahlung als auch die Verwendung von ATM- und DNA-PK-Inhibitoren.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Chemikalie:

Agarose (Certified Molecular Biology)
Agarose (Small DNA Low Melt)
Agarose (Typ VII)
Borsäure
BSA
Collagenase
DAPI
DMEM (D5796)
DMSO
EDTA
Ethanol
Ethidiumbromid
FCS
Formaldehyd (säurefrei 37 %ig)
Glycin
Hams F12
HBSS
HCl
Hyaluronidase
Isopropanol
KCl
 KH_2PO_4 (2H₂O)
MEMearle's (M4655)
Mounting Medium (H-1000)
N-Laurosyl-Sarcosin
 Na_2HPO_4 (2H₂O)
NaCl
NaOH
NEAA
Paraffin (Histosec Pastillen)
PBS (Instamed-Pulver)
Penicillin-Streptomycin (P/S)
PFA
Pronase E
REAL Target Retrieval Solution (10x)
TritonX-100
Trypsin
Tween20
Xylol

Hersteller:

BioRad
Biozym
Sigma
Roth
Applichem
Cell systems
Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich
Roth
Roth
Roth
Biochrom
Roth
Roth
c'c'pro
Sigma-Aldrich
Roth
Roche
Roth
Roth
Roth
Sigma-Aldrich
Vectashield
Merck
Roth
Roth
Roth
Biochrom
VWR
Biochrom
Biochrom
Roth
Applichem
DAKO
Roth
Cell systems
Roth
Roth

3.1.2. Lösungen

Agarose (Pulsfeld)

1,4 % Agarose Typ VII (Low melting) in PBS
(Pulsfeldblöckchenagarose)

	0,8 % Certified Molecular Biology Agarose in 0,5 x TBE(Gelagarose)	
	0,8 % Small DNA Low Melt Agarose in TE (Taschenagarose)	
DAPI-Lösung	0,2 µg/ml DAPI in PBS	
Enzymmix-Lösung	Trypsin (90 Units/ml) Collagenase (90 Units/ml)) Hyaluronidase (600 Units/ml) in F12	
Ethidiumbromidlösung (Pulsfeld)	1 µg/ml Ethidiumbromid in 0,5 x TBE	
Fixativ (Gewebe)	66 mM Na ₂ HPO ₄ , 66 mM KH ₂ PO ₄ (2H ₂ O), 5 % Formaldehyd in MilliQ	pH 7,3
Fixativ (Zellkultur)	3 % PFA in PBS	
Lysepuffer (Pulsfeld)	1% (w/v) N-Laurosyl-Sarcosin, 1 mg/ml PronaseE, 0,5 M Na ₂ -EDTA	pH 8
Na ₂ -EDTA	0,5M Na ₂ -EDTA in MilliQ	
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ in MilliQ	pH 7,4
PBS/FCS	1 % FCS in PBS	
PBS/BSA	2 % BSA in PBS	
PBS-T	0,1 % Tween 20 in PBS	
Permeabilisierungslösung (Immunfluoreszenz):	0,2 % TritonX-100 in PBS	
0,5 x TBE-Puffer	44,5 mM Tris, 44,5 mM Borsäure, 1 mM Na ₂ -EDTA	pH 8
TBS	20 mM Tris/HCl, 137 mM NaCl	pH 7,6
TBS-T	0,1% Tween20 in TBS	
1x TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, 1 mM Na ₂ -EDTA	pH 8

Trypsin/EDTA (Zellkultur):

0,5 M EDTA ,
2,5 % (v/v) Trypsin in PBS

pH 8

3.1.3. Antikörper

Primäre Antikörper:

Artikelnummer:

Hersteller:

Rabbit anti 53BP1	IHC-00001	Bethyl/Biomol
Mouse anti ATM-pS1981	200-301-400	Rockland/Biomol
Mouse anti Chx10 (E-12)	sc-365519	Santa Cruz
Mouse anti Glutaminsynthetase	610518	BD Biosciences
Mouse anti γ H2AX (Ser139)	05-636	Millipore
Rabbit anti H3K4me3	9727	Cell signaling tech
Mouse anti KAP1	ab22553	Abcam
Rabbit anti KAP-pS824	3640-1	Epitomics
Rabbit anti Ki67	ab16667	Abcam
Mouse anti Lim1 + 2(4F2)		DSHB
Mouse anti Pax6		DSHB

Sekundäre Antikörper:

Alexa Fluor®488 goat-anti-mouse	A11001	Invitrogen
Alexa Fluor®488 goat-anti-rabbit	A11008	Invitrogen
Alexa Fluor®594 goat-anti-mouse	A11005	Invitrogen
Alexa Fluor®594 goat-anti-rabbit	A110012	Invitrogen

3.1.4. Inhibitoren

DNA-PKi	Nu7441	Tocris
ATMi	Ku60019	Tocris

3.1.5. Zelllinien

Zelllinie	Medium	Herkunft
NIH-3T3 (Primäre murine Fibroblasten)	<i>Dulbecco's minimal essential medium</i> (DMEM) + 10 % fötales Kälberserum (FCS), + 1 % <i>Non essential amino acids</i> (NEAA), + 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin	Aaron Goodarzi, Sussex, UK

3.1.6. Mausstämme

	Maus-Stamm	Beschreibung	Alter	Herkunft
WT	C57BL/6	Wildtyp-Mäuse	3 Monate	TU-Darmstadt
AT	129S6/SvEvTac- <i>Atm</i> ^{tm1Awb} /J	Bei der homozygoten A-T Maus Mutante wurde durch Einbringen eines Vektors, welcher ein <i>Neo Resistance Gen</i> enthält, das ATM Gen inaktiviert. Dabei wurde eine <i>Non sense(truncation)</i> Mutation in etwa dem Genabschnitt von ATM hergestellt, welcher bei Menschen mit <i>Ataxia telangiectasia</i> (AT) mutiert ist.	8 Wochen	Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) über Charles River (Sulzfeld, Germany)

SCID	CB-17/Icr-Prkdc scid/Crl	Diese SCID-Maus Mutante besitzt eine autosomal rezessive Mutation auf dem Prkdc-Gen (=Prkdc ^{scid}). Die SCID Mäuse sind homozygot für das Prkdc ^{scid} Allel, welches sich auf dem zentromerischem Ende von Chromosom 16 befindet.	8 Wochen	Charles River (Sulzfeld, Germany)
-------------	--------------------------	--	----------	-----------------------------------

Die Mäuse lebten im Tierstall der TU Darmstadt in einem Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 h. Sie wurden mit Wasser und spezieller Laborkost (Altromin, Deutschland) versorgt. Die Raumtemperatur betrug 22 ± 2 °C und die Luftfeuchtigkeit 55 ± 10 %. Die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes wurden befolgt und es fanden regelmäßige veterinärmedizinische Untersuchungen statt.

Für die von Charles Rivers bezogenen Mäuse wurde eine vom Amtstierarzt vorgeschriebene Erholungszeit zwischen Ankunft der Tiere und Experiment eingehalten.

3.1.7. Geräte und Softwareprogramme

<u>Geräte:</u>	<u>Bezeichnung:</u>	<u>Hersteller:</u>
Chemilumineszenz-Detektionsgerät	ChemiSmart 5000	Vilber Lourmat
Dosimeter	Diados	PTW Freiburg
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200 M	Zeiss
Inkubatoren	Hera cell 240	Thermo Scientific
Inversmikroskop (Zellkultur)	Eclipse TS100	Nikon
Kamerasystem	Axioskop	Zeiss
Konfokales Scanningmikroskop	Leica TCS SP5 II	Leica
Kühl- und Gefrierschränke		Liebherr
Kühltruhe-80°C	Herafreeze	Thermo scientific
Magnetrührer	Varimag®	H+P Labortechnik
	MRHei-Standard	Heidolph
Mikrotom	Jung RM2055	Leica
Mikroliterpipetten		Gilson
pH-Meter	pMX2000	WTW
Pipettierhilfe	Pipetboy	Integra
Pulsfeld-Gelelektrophorese-System	Power Supply	Pharmacia biotech
Röntgenröhre	Isovolt Titan E	GE Inspection
	Power Module 3Ph	Technologies
Sterilwerkbänke	Herasafe	Thermo scientific
Stickstofftank	Locator 8+	Thermolyne
Taumler	3011	GFL
Tischschwenkplatte		Fröbel
Tischzentrifuge		neolab
Vortex	genie2	Scientific industries
Waagen	TE1502S	Satorius
	TE153S-DS	Satorius
Wasserbad		Julabo
Zählkammer	Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Zentrifugen	Centrifuge 5804R	Eppendorf
	Centrifuge 5810R	Eppendorf
	Centrifuge 5415R	Eppendorf

Software:

Dokumentation von Gelen	ChemiCapt	Vilber Lourmat
Image J		Open Source
Leica LAS AF Lite		Leica
METAFER	4 V3.4.0	Metasystems
Photoshop CS2		Adobe

3.1.8. Sonstige Verbrauchsmaterialien

Material:

Deckgläser (Glas)
Einbettkassetten
Eppendorf-Tube
Objektträger Superfrost
Pap Pen
Parafilm
Pasteurpipetten
Pinzetten
Pipettenspitzen
Wischtücher KimWipes
Zellkulturflaschen 25 cm²
Zellkulturflaschen 75 cm²
Zellkulturschalen (Nunclon) Ø 35 mm
Zellkulturschalen (Nunclon) Ø 50 mm
Zellkulturplatten (6 well)
Zentrifugenröhrchen 15 ml
Zentrifugenröhrchen 50 ml
Zellsiebe 40 µm

Hersteller:

Roth
Roth
Roth
Roth
Kisker Biotech
Roth
Roth
WPI
Sarstedt
Neolab
TPP
TPP
Nunc
Nunc
TPP
Sarstedt
Neolab
BD Biosciences

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Kultivierung von Zellen :

Die murinen Fibroblasten der Zelllinie NIH-3T3 wurden in einem Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C und einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ Anteil gehalten. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen (75 cm²) in *Dulbecco's minimal essential medium* (DMEM), welches mit 5 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % *Non essential amino acids* (NEAA), sowie 100 Units/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin versetzt wurde. Die Zellen wurden alle 3 Tage subkultiviert in einem Verhältnis von 1:6. Dafür wurde das verbrauchte Medium aus der Flasche entfernt, die Zellen wurden 1-mal mit 10 ml PBS gewaschen und für 5 min bei 37°C mit 2 ml einer 0,1 % Trypsin/0,5 mM EDTA Lösung inkubiert, um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Zu der Zellsuspension wurden 4 ml vorgewärmtes Medium gegeben und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl der Lösung bestimmt. Es wurden je ~ 600.000 Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit 16 ml frischem, vorgewärmtem Medium weiter kultiviert. Für Experimente mit murinen Fibroblasten (NIH-3T3) wurden je 4 sterile Glas- Deckgläser (Ø 10 mm) in Zellkulturschalen (Ø 35 mm) ausgelegt und je ~ 100.000 Zellen in 2 ml frischem, vorgewärmtem Medium ausgesät. Die Zellen wurden bis zu einem konfluenten Stadium wachsen gelassen, was bei diesen Zellen etwa 5 Tage dauert.

Kryokonservierung und Auftauen von Zellen:

Mit Hilfe der Kryokonservierung ist es möglich Zellen über einen langen Zeitraum haltbar zu lagern. Dazu wurde das verbrauchte Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt, die Zellen wurden 1-mal mit 10 ml PBS gewaschen und für 5 min bei 37°C mit 2 ml einer 0,1 % Trypsin/0,5 mM EDTA Lösung inkubiert, um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Anschließend wurde Medium zugegeben [DMEM; 5 % FCS; 1 % NEAA; 100 Units/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin] und die Zellzahl der Suspension mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (8 min, 300 g, 4°C) und der Überstand des Mediums abgezogen. Das verbleibende Zellpellet wurde in 0,8 ml kaltem Medium resuspendiert und mit zusätzlich 0,8 ml Einfriermedium [60 % FCS, 20 % DMSO, 20 % Medium] versetzt. Diese Lösung wurde in ein Kryoröhrchen überführt, langsam (-1°C/h) auf -80°C gekühlt und nach 1-2 Tagen in flüssigem Stickstoff bei -197°C eingefroren. Um die eingefrorenen Zellen wieder kultivieren zu können wurde das Kryoröhrchen für 3 min bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Die Zellsuspension wurde in ein Falcontube überführt und in 10 ml warmem Medium resuspendiert. Nach Zentrifugation der Zellen (10 min, 300 g, 4°C) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert und die Lösung in eine Zellkulturflasche (25 cm²) überführt. Nach einer Kultivierungszeit von 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mit Hilfe der Trypsin/EDTA Lösung in eine größere Zellkulturflasche (75 cm²) transferiert.

3.2.2. Bestrahlung von Zellen mit Röntgenstrahlung

Die Bestrahlung von murinen Fibroblasten (NIH-3T3) wurde in einer Röntgenröhre (Titan Isovolt 160 von GE) durchgeführt. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen (Ø 35 mm) bei einer Spannung von 135 kV und einer Stromstärke von 19 mA bestrahlt. Bei einem Abstand von 45 cm zwischen Strahlenausstrittsfenster und Zellen, sowie einer Filterung von 1 mm Aluminium ergab sich eine Dosisleistung von 1,82 Gy/min. Die Dosisleistung wurde bei jeder Bestrahlung durch Messung mit einem PTW Weichstrahlkammer- Dosimeter überprüft. Nach Bestrahlung wurden die Zellen bis zu ihrer Fixierung bei 37°C und 5 % CO₂ weiter kultiviert. Bei den angewendeten Strahlendosen ist zu beachten, dass die Zellen auf Glas-Deckgläsern bestrahlt wurden, wobei die durch den Photoeffekt erzeugten Sekundärelektronen im Glas die Zellen zusätzlich schädigen¹⁸. Dieser Schaden lässt sich jedoch nicht durch das Dosimeter detektieren und erhöht die effektive Dosis um den Faktor ~ 2. Im Ergebnisteil wurden die Strahlendosen mit der effektive Dosis angegeben.

3.2.3. Fixierung von Zellen

Um die Zellen zu fixieren wurden die Deckgläser, auf denen die Zellen festgewachsen waren, zum jeweiligen Zeitpunkt in 3,7 % Formaldehyd (FA)-Lösung überführt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3-mal 10 min mit PBS gewaschen und für 5 min mit 0,2 % TritonX-100 in PBS permeabilisiert. Danach wurden die Zellen erneut 3-mal 10 min mit PBS gewaschen und über Nacht in einer Blocklösung (1 % FCS in PBS) bei 4 °C inkubiert. Nach Entfernen der Blocklösung konnten die Zellen entweder in PBS bei 4 °C einige Tage gelagert werden oder es konnte direkt eine Antikörperfärbung durchgeführt werden.

3.2.4. Bestrahlung von Mäusen mit Röntgenstrahlung

Vor der *in vivo*-Bestrahlung wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt. Dazu wurde ein Wattebällchen mit Isofluran getränkt und zusammen mit der Maus in die Bestrahlungsapparatur (Plastikbox) gebracht. Nach 10 s wurde das mit Narkosemittel getränkte Wattebällchen aus der Bestrahlungsapparatur entfernt um eine Überdosierung zu vermeiden. Die Maus wurde in der Bestrahlungsapparatur in einer Röntgenröhre (Titan Isovolt 160 von GE), bei einer Spannung von 135 kV und einer Stromstärke von 19 mA, bestrahlt. Bei einem Abstand von 45 cm zwischen Strahlenausstrittsfenster und Oberfläche der Maus, sowie einer Filterung von 1 mm Aluminium, ergab

sich eine Dosisleistung von 1,82 Gy/min. Die Dosisleistung wurde bei jeder Bestrahlung durch Messung mit einem PTW Weichstrahlkammer- Dosimeter überprüft. Zwischen Eintritt der Strahlung in die Maus und Austritt der Strahlung aus der Maus entsteht ein Dosisabfall von $\sim 26\%$. Um eine homogenere Verteilung der Dosis zu erreichen wurde die Maus von 2 Seiten bestrahlt und die Bestrahlungsmodalitäten so gewählt, dass in der Maus eine gleichmäßige Dosis von 1 Gy erreicht wurde.

3.2.5. Präparation von Mäusen und Fixierung von Maus-Organen

Die Mäuse wurden entsprechend ihren Zeitpunkten nach Röntgenbestrahlung durch Genickbruch getötet und dekapitiert. Nach Öffnen des Bauchraumes wurden die Organe (Nieren) zügig entnommen und in 5 % neutral gepufferter Formaldehydlösung (Fixativ) fixiert und gelagert. Ebenfalls wurden aus dem Schädel der Maus die Augen, sowie das Gehirn entnommen und im Fixativ gelagert. Die Nieren, sowie das Gehirn wurden in etwa gleich große Stücke geteilt, um eine bessere Diffusion des Fixativs in die Gewebe zu gewährleisten. Anschließend wurden alle Organstücke in Einbettkassetten überführt, welche für 20 h im Fixativ bei RT gelagert wurden.

3.2.6. Präparation, Bestrahlung und Fixierung von Retina- Explantaten

Für die Gewinnung von Retina- Explantaten wurden Mäuse mit CO₂ begast und getötet. Anschließend wurden die Augen aus dem Schädel entnommen und in F12 auf Eis gelagert. Mit Hilfe von Pinzetten und unter Verwendung eines Binokulars wurde das umliegende Augengewebe, sowie das Pigmentepithel von der Retina entfernt. Der Glaskörper mit der umliegenden Retina (Abbildung 16) wurde anschließend in Medium [DMEM; 10 % FCS; 1 % L-Glutamin, 1 % NEAA; 100 Units/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin] überführt. Die *ex vivo*-Bestrahlung von Retina-Explantaten mit Röntgenstrahlung erfolgte unter den gleichen Bestrahlungsmodalitäten wie unter Punkt 3.2.4. beschrieben. Die Retina-Explantate wurden in 24-Loch Zellkulturplatten, auf einer vorgewärmten Aluminiumplatte, mit einer Dosis von 1 Gy bestrahlt. Nach der Röntgenbestrahlung wurden die Explantate im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ gelagert und nach entsprechenden Zeitpunkten in 5 % neutral gepufferter Formaldehydlösung (Fixativ) in Einbettkassetten für 20 h bei RT fixiert.

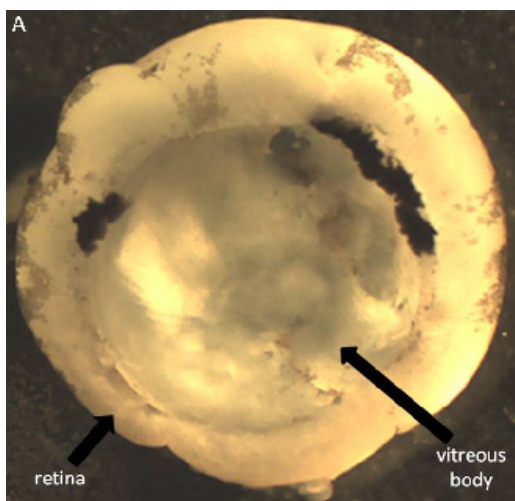


Abbildung 16: Aufnahme eines Maus-Retinaexplantats bestehend aus Glaskörper und umgebender Retina.

Die *ex vivo*-Bestrahlung von Retina-Explantaten mit Schwerionen (²²Titan-Ionen) wurde am Teilchenbeschleuniger der GSI (Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH in Darmstadt) durchgeführt. Dabei wurden ²²Ti-Ionen durch hohe elektrische Felder im Linearbeschleuniger UNILAC (Universal Linear Accelerator) und im folgenden Ringbeschleuniger SYS18 (Schwerionensynchrotron) beschleunigt. Durch die Ablenkung von Ionen über Magnete konnten die Retina-Explantate dann gezielt mit einer Energie von 800 MeV/u (Megaelektronenvolt pro Nukleon) und einem LET von 128 keV/ μ m bestrahlt werden. Die Fluenz der Bestrahlung betrug dabei $7,5 \cdot 10^6$ Ionen/cm². Die Retina-

Explantate wurden in verschlossenen 6-Loch Zellkulturplatten, welche vollständig mit Medium [DMEM; 10 % FCS; 1 % L-Glutamin, 1 % NEAA; 100 Units/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin] gefüllt waren, senkrecht stehend bestrahlt. Da sich alle Retina-Explantate dadurch mit den Glaskörpern nach unten ausrichten war es anschließend möglich die Ebene des Strahlendurchgangs nachvollziehen zu können. Nach Bestrahlung der Explantate mit ^{22}Ti -Ionen wurden die Explantate im Inkubator bei 37°C und 5 % CO_2 gelagert und nach entsprechenden Zeitpunkten in 5 % neutral gepufferter Formaldehydlösung (Fixativ) in Einbettkassetten für 20 h bei RT fixiert.

3.2.7. Einbettung fixierter Maus-Organe und Retina-Explantate in Paraffin und Anfertigung von Paraffin-Gewebeschnitte

Nach der Fixierung wurden die Organe und Retina-Explantate in den Einbettkassetten dehydriert. Dazu wurden die Organe oder Retina-Explantate durch folgende Lösungen geführt:

	Organe (Niere, Auge, Gehirn)	Retina- Explantate
70 % Ethanol	30 min	30 min
70 % Ethanol	45 min	40 min
96 % Ethanol	30 min	20 min
96 % Ethanol	30 min	20 min
96 % Ethanol	45 min	30 min
100 % Ethanol	45 min	30 min
100 % Ethanol	45 min	45 min
Xylol	60 min	45 min
Xylol	30 min	20 min
Paraffin	30 min	20 min
Paraffin	30 min	20 min
Paraffin	45 min	30 min
Paraffin	60 min	45 min

Für die Paraffinbehandlung der Organe wurde das Paraffin im Wärmeschrank bei 70°C geschmolzen und anschließend die Organe in den Einbettkassetten in die Paraffinlösung eingebracht. Nach Abschluss der Paraffinbehandlung wurden die Organe aus den Einbettkassetten bei 70°C in Paraffin-gefüllte Förmchen überführt und in die gewünschte Schnittposition gebracht. Nach Erkalten des Paraffin-Blöckchens wurden mit Hilfe eines Mikrotoms 4 μm dicke Paraffinschnitte der Gewebe angefertigt und auf beschichtete Objektträger gezogen. Nach Trocknen der Paraffinschnitte im Wärmeschrank bei 50°C für 12 h wurden die Objektträger bei RT bis zu ihrer Verwendung gelagert.

3.2.8. Aufbereitung von Gewebeschnitten für die Immunfluoreszenzfärbung

Um Paraffinschnitte von Geweben für Immunfluoreszenzfärbungen verwenden zu können wurden diese rehydriert. Dazu wurden die Paraffinschnitte auf den Objektträgern durch folgende Lösungen geführt:

Xylol	8 min
Xylol	8 min
100 % Ethanol	5 min
100 % Ethanol	5 min
96 % Ethanol	5 min
90 % Ethanol	5 min
80 % Ethanol	5 min
70 % Ethanol	5 min
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	5 min
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	5 min

Die anschließende Behandlung der Gewebe auf den Objektträgern mit einem Citratpuffer für 1 h bei 100°C im Wasserbad bewirkt eine Antigendemaskierung, welche durch die Gewebefixierung entstanden ist. Nach Abkühlen des Citratpuffers wurden die Gewebeschnitte in PBS überführt und zweimal in PBS gewaschen. Die Lagerung der aufbereiteten Gewebeschnitte vor der Immunfluoreszenzfärbung betrug maximal 24 h bei 4°C in PBS.

3.2.9. Immunfluoreszenzfärbung von Zellen und Maus-Geweben

Durch die Verwendung von Antikörpern, welche spezifisch gegen bestimmte Proteine gerichtet sind, ist es möglich, diese im zu untersuchenden Gewebe bzw. Zellkompartiment anzufärben und deren Lokalisation zu bestimmen. Je nach Art der zu untersuchenden Proteine oder der Beschaffenheit der Gewebe ist die Qualität der Färbung dabei abhängig von der Materialfixierung, der Konzentration der Antikörper, der Inkubationszeit, sowie der Temperatur bei der die Antikörperfärbung erfolgt.

Bei der Methode der Immunfluoreszenzfärbung bindet der gegen ein bestimmtes Protein gerichtete Primärantikörper spezifisch an das Antigen des nachzuweisenden Proteins (Abbildung 17). Durch die Verwendung eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörpers, welcher spezifisch an den Primärantikörper bindet, lässt sich das nachzuweisende Protein in der Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar machen.

Durch die Behandlung von Geweben oder Zellen mit einem fluoreszierenden Farbstoff (z.B. DAPI), welcher an die DNA bindet, lassen sich mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie auch ganze Zellkerne visualisieren.

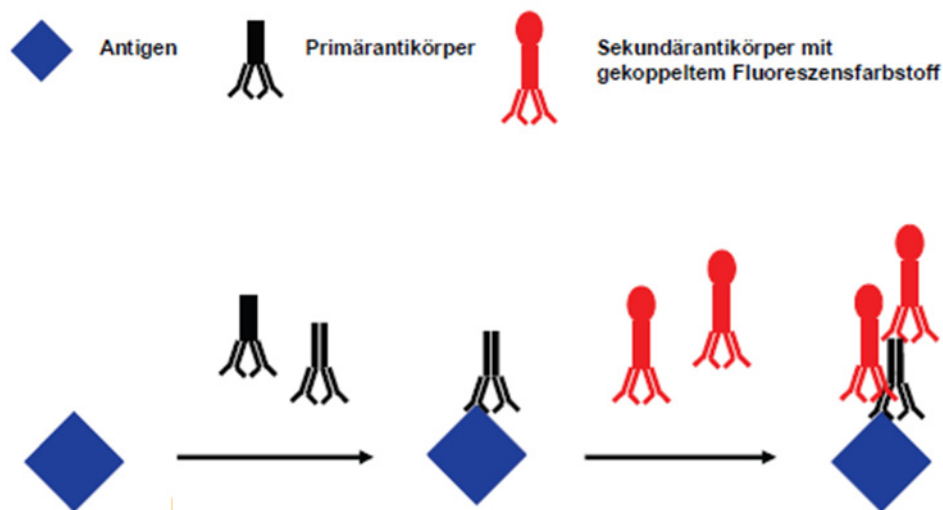


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Methode der Immunfluoreszenzfärbung. Bei der Immunfluoreszenzfärbung bindet der gegen ein bestimmtes Protein gerichtete Primärantikörper spezifisch an das Antigen des nachzuweisenden Proteins. Durch die Verwendung eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörpers, welcher spezifisch an den Primärantikörper bindet, lässt sich das nachzuweisende Protein in der Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar machen.

Für Immunfluoreszenzfärbungen von murinen Fibroblasten (NIH-3T3) wurden die Glas-Deckgläser, auf denen die Zellen fixiert wurden, auf Parafilm in eine feuchte Kammer überführt. Pro Deckglas wurden 40 µl einer Primärantikörperlösung (= Primärantikörper /1 % FCS in PBS) aufgetragen (Antikörperkonzentration siehe Tabelle 1). Nach 1 h Inkubationszeit bei RT wurden die Zellen 3-mal für 10 min in PBS-T gewaschen. Darauf folgte die Auftragung von 40 µl Sekundärantikörperlösung pro Deckglas (= Sekundärantikörper /1 % FCS in PBS) (Antikörperkonzentration siehe Tabelle 1). Nach einer Inkubationszeit von 30 min im Dunkeln wurde die Lösung entfernt und die Zellen 3-mal für 10 min in PBS-T gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit einer DAPI-Lösung gefärbt (0,2 µg/ml DAPI in PBS) und 3-mal für 10 min PBS gewaschen. Danach konnten die Zellen mit je 3 µl *Mounting Medium* pro Deckglas beschichtet und auf einen Objektträger aufgebracht werden. Um die

Zellen vor dem Austrocknen zu schützen wurde das Deckglas auf dem Objektträger mit klarem Nagellack versiegelt. Die Zellen wurden bis zur Immunfluoreszenzmikroskopie bei 4°C gelagert.

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Mouse anti γ H2AX	1:800	Alexa Fluor® 488 goat-anti-rabbit	1:500

Tabelle 1: Konzentrationen verwendeter Antikörper bei Immunfluoreszenzfärbungen von murinen Fibroblasten (NIH-3T3).

Für die Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten wurden die in PBS gelagerten Objektträger in eine feuchte Kammer überführt. Die Objektträger wurden an den Rändern trocken gewischt und mit einem Fettstift (*Pap Pen*) umrandet, um das Auslaufen der Antikörperlösung zu vermeiden. Pro Objektträger wurden 140 μ l Antikörperlösung des primären Antikörpers aufgetragen. Der primäre Antikörper wurde, wie in Tabelle 2 aufgeführt, in 0,2 % TritonX-100/PBS verdünnt. TritonX-100 bewirkt eine Permeabilisierung der Zellmembran und verbessert so das Eindringen des Antikörpers in das Gewebe. Nach Inkubation des Primärantikörpers für 5 h bei 37°C wurden die Gewebeschnitte 3-mal für 10 min in PBS-T gewaschen. Anschließend wurden die Ränder der Objektträger erneut getrocknet und 140 μ l Antikörperlösung des sekundären Antikörpers aufgetragen. Der sekundäre Antikörper wurde, wie in Tabelle 2 aufgeführt, in 0,2 % TritonX-100/PBS verdünnt. Die Inkubation erfolgte für 2,5 h bei RT im Dunkeln gefolgt von 2-maligem Waschen der Gewebeschnitte in PBS-T.

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Rabbit anti 53BP1	1:500	Alexa Fluor® 594 goat-anti-rabbit	1:400
Mouse anti ATM-pS1981(rockland)	1:200	Alexa Fluor® 488 goat-anti-mouse	1:400
Rabbit anti Rhodopsin (CERN901)	1:500	Alexa Fluor® 594 goat-anti-rabbit	1:500
Mouse anti Chx10 (E-12)	1:100	Alexa Fluor® 488 goat-anti-mouse	1:400
Mouse anti Glutaminsynthetase	1:100	Alexa Fluor® 488 goat-anti-mouse	1:400
Mouse anti γ H2AX (Ser139)	1:400	Alexa Fluor® 488 goat-anti-mouse	1:600
Rabbit anti H3K4me3	1:500	Alexa Fluor® 594 goat-anti-rabbit	1:400
Mouse anti KAP	1:200	Alexa Fluor® 594 goat-anti-mouse	1:400
Rabbit anti KAP-pS824	1:200	Alexa Fluor® 594 goat-anti-rabbit	1:400
Rabbit anti Ki67	1:500	Alexa Fluor® 594 goat-anti-rabbit	1:400
Mouse anti Lim1 + 2(4F2)	1:100	Alexa Fluor® 488 goat-anti-mouse	1:400
Mouse anti Pax6	1:50	Alexa Fluor® 488 goat-anti-mouse	1:400

Tabelle 2: Konzentrationen verwendeter Antikörper bei Immunfluoreszenzfärbungen von murinen Geweben.

Für das Anfärben der DNA in den Zellkernen wurden die Gewebeschnitte für 15 min mit einer DAPI-Lösung (0,2 μ g/ml DAPI in PBS) inkubiert und anschließend 3-mal für 10 min mit PBS gewaschen. Die Ränder der Objektträger wurden trocken gewischt und je Objektträger 60 μ l Mounting Medium auf den Gewebeschnitten verteilt. Die Schnitte wurden abschließend mit einem Deckglas überdeckt und mit Nagellack versiegelt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

3.2.10. Analyse von G1-Phase Zellen

Da murine Fibroblasten nur begrenzt konfluent wachsen befinden sich einige der auszuwertenden Zellen noch in der S-, M- oder G2-Phase des Zellzykluses. Um diese Zellen, welche sich kurz vor der Bestrahlung in der S-Phase befanden bzw. bereits die S-Phase durchlaufen haben oder aber auch nach Bestrahlung in die S-Phase eingetreten sind, von der Auswertung auszuschließen, wurde den Zellen 4 h vor Bestrahlung 1 μ M EDU (*5-ethynyl-2'-deoxyuridine*) zugegeben, welches bis zur Fixierung der Zellen einwirken konnte. EDU ist ein Thymidin Analog, welches sich während der DNA-Synthese in die DNA einbaut. Nach Bestrahlung, Fixierung und Antikörperfärbung der Zellen, wurden EDU-positive Zellen mit Hilfe eines „Click it Kits“ für die Fluoreszenzmikroskopie angefärbt (Protokoll nach Kit-Beschreibung). Darauf folgte die Anfärbung der DNA der Zellkerne mit DAPI. Durch die Bestimmung der Intensitäten der EDU- und DAPI-Färbungen an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200 M,

Zeiss), mit Hilfe eines Axioskop- Kamerasystems und des Softwareprogrammes METAfer 4 V3.4.0 von Metasystems, konnte die Zellzyklusphase der einzelnen Zellen ermittelt werden. Dabei wurden EDU-positive Zellen der S-Phase zugeordnet und Zellen mit einer starken DAPI-Färbung der G2-Phase, da Zellen in der G2-Phase einen doppelten DNA-Gehalt besitzen. Die verbleibenden EDU-negativen G1-Phase Zellen, welche einen einfachen DNA-Gehalt besitzen, wurden für die Auswertung verwendet. Bei den murinen Geweben (Retina, Niere, Gehirn) wurden ebenfalls nur die Zellen für die Auswertung verwendet, welche sich in der G0/G1 Phase des Zellzyklus befanden. Aus diesem Grund wurden in der Niere Tubuluszellen der proximalen und distalen Tubuli und im Gehirn Zellen der Großhirnrinde betrachtet, welche sich bei adulten Mäusen im ausdifferenzierten Stadium befinden. In der adulten Retina befinden sich ebenfalls alle Zellen in einem ausdifferenzierten Zustand. Bei den betrachteten Vorläufer-Zellen der postnatalen Retina handelt es sich um noch nicht vollständig ausdifferenzierte Zellen, jedoch sind diese Vorläufer-Zellen bereits aus dem Zellzyklus ausgetreten.

3.2.11. Aufnahmen und Bildverarbeitung von Immunfluoreszenzfärbungen

Für die Dokumentation von Immunfluoreszenzfärbungen der Retinae wurde ein konfokales Scanning Mikroskop (Leica TCS SP5 II) verwendet. Die Bilder wurden entweder mit 630-facher oder 1000-facher Vergrößerung mit Hilfe der Software Leica LAS AF aufgenommen. Die *Maximum intensity projections* bestehen aus je 5-20 Ebenen. Der Abstand zwischen den aufgenommenen Ebenen betrug 0,3 μm . Die weitere Bildverarbeitung wurde mit ImageJ oder Photoshop CS2 durchgeführt.

3.2.12. Auswertung mittels Foci-Analyse

Für die Quantifizierung von DSBs in murinen Fibroblasten und Geweben der Maus (Niere, Gehirn), wurde am Fluoreszenzmikroskop die Anzahl von γH2AX - oder 53BP1-Foci pro Zelle ermittelt. Dies erfolgte visuell am Fluoreszenzmikroskop bei einer 1000-fachen Vergrößerung. Die Auswertung von γH2AX -Foci in den Zellen der Retinae fand mit Hilfe von Aufnahmen am konfokalen Scanning Mikroskop mit der Software Leica LAS AF am Bildschirm statt.

Die Lokalisation von γH2AX -Foci innerhalb des Zellkerns adulter Stäbchen-Photorezeptoren wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten mittels Line-Plot Analyse mit Hilfe der Leica LAS AF Software bestimmt. Dafür wurden die Retinaschnitte neben der γH2AX -Färbung zusätzlich gegen H3K4me3, als Marker für die euchromatischen Bereiche in den Photorezeptoren, gefärbt. Des Weiteren wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt. Die intensiv durch DAPI gefärbten Bereiche in den Zellkernen, entsprechen dem konstitutiven Heterochromatin, während die dunkleren DAPI-gefärbte Bereiche, die nicht mit H3K4me3 kolokalisieren, das fakultative Heterochromatin darstellen. Für die Zuordnung eines γH2AX -Focus zu den entsprechenden Chromatinbereichen wurde eine Linie durch den Mittelpunkt des Focus und durch den Mittelpunkt des zugehörigen Zellkerns gelegt (Abbildung 18). Mit Hilfe der Line-Plot-Funktion konnte dann das Fluoreszenz-Intensitätsmaximum des γH2AX -Signals den drei entsprechenden Chromatinbereichen zugeordnet werden.

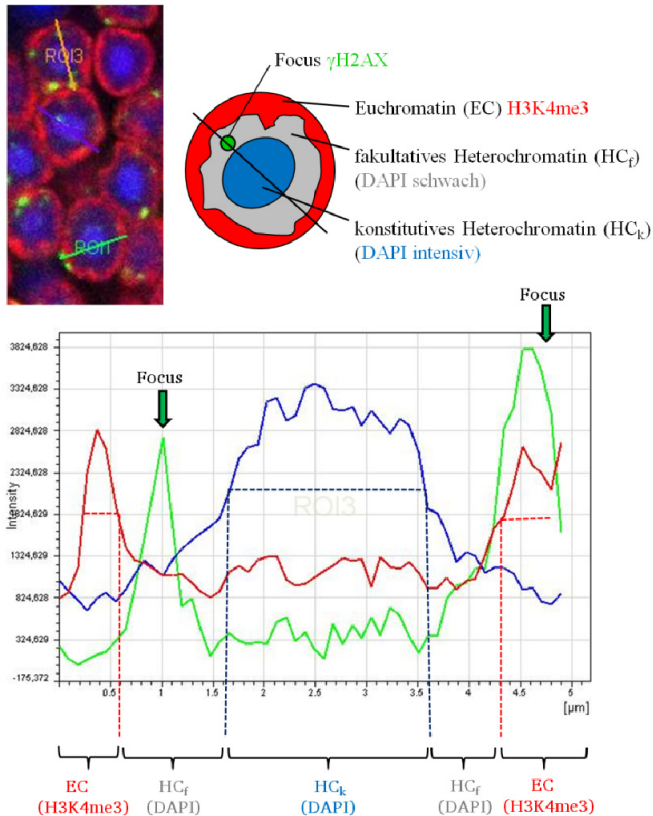


Abbildung 18: Bestimmung der Lokalisation eines γ H2AX-Focus innerhalb des Zellkerns eines Stäbchen-Photorezeptors mittels Line-Plot Analyse. Retinaschnitte wurden neben der γ H2AX-Färbung gegen H3K4me3, als Marker für euchromatische Bereiche, gefärbt. Die intensiv durch DAPI angefärbten Bereiche in den Zellkernen entsprechen dem konstitutiven Heterochromatin, während die dunkleren DAPI-gefärbten Bereiche, die nicht mit H3K4me3 kolokalisieren, das fakultative Heterochromatin darstellen. Für die Zuordnung eines γ H2AX-Focus zu den entsprechenden Chromatinbereichen wurde eine Linie durch den Mittelpunkt des Focus und durch den Mittelpunkt des zugehörigen Zellkerns gelegt. Mit Hilfe der Line-Plot-Funktion konnte dann das Fluoreszenz-Intensitätsmaximum des γ H2AX-Signals den drei entsprechenden Chromatinbereichen zugeordnet werden.

3.2.13. Statistik

Zellkultur:

Bei der Inhibitorstudie mit murinen Fibroblasten (NIH-3T3) wurde pro Experiment die durchschnittliche Anzahl (Mittelwert) an γ H2AX-Foci/Zelle aus 30 Zellen ermittelt. Die dargestellten Ergebnisse geben den Mittelwert der durchschnittlichen Anzahl an γ H2AX-Foci/Zelle aus 1-5 Experimenten an ($n=1-5$). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte aus 3-5 Experimenten dar.

Gewebe:

Bei der Quantifizierung von γ H2AX-Foci in Zellen der Niere und des Gehirns wurde pro Färbung die durchschnittliche Anzahl (Mittelwert) an γ H2AX-Foci /Zelle aus 30 Zellen ermittelt. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte der durchschnittlichen Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle aus 2 Färbungen unterschiedlicher Paraffinschnitte einer Maus ($n=1$). Die Fehlerbalken stellen die Streuung zwischen den ermittelten Einzelwerten aus 2 unabhängigen Färbungen dar.

Retina:

Bei der Quantifizierung von γ H2AX-Foci in Zellen der Retina wurde pro Färbung die durchschnittliche Anzahl (Mittelwert) an γ H2AX-Foci /Zelle aus 20 Zellen ermittelt. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte der durchschnittlichen Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle aus 2 Färbungen unterschiedlicher Paraffinschnitte einer Maus ($n=1$). Die Fehlerbalken stellen die Streuung zwischen den ermittelten Einzelwerten aus 2 unabhängigen Färbungen dar.

Retina-Explantate:

Bei der Quantifizierung von γ H2AX-Foci in Photorezeptoren der Retina-Explantate wurde pro Experiment die durchschnittliche Anzahl (Mittelwert) an γ H2AX-Foci /Zelle aus 20 Zellen ermittelt. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte der durchschnittlichen Anzahl an γ H2AX-Foci pro

Zelle aus 2 Färbungen unterschiedlicher Mäuse (n=2). Die Fehlerbalken stellen die Streuung zwischen den ermittelten Einzelwerten aus 2 unabhängigen Färbungen dar.

Lokalisation:

Bei der Untersuchung zur Lokalisation von γ H2AX-Foci innerhalb verschiedener Chromatinbereiche von Photorezeptoren wurde pro Färbung die durchschnittliche Anzahl (Mittelwert) an γ H2AX-Foci für den jeweiligen Chromatinbereich ermittelt. Pro Zeitpunkt wurde dabei die prozentuale Verteilung von je 80 Foci innerhalb der Chromatinregionen errechnet und auf die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci/Zelle bezogen.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte der durchschnittlichen Anzahl an γ H2AX-Foci pro Chromatinregion aus 2 Färbungen unterschiedlicher Paraffinschnitte einer Maus (n=1). Die Fehlerbalken stellen die Streuung zwischen den ermittelten Einzelwerten aus 2 unabhängigen Färbungen dar.

Bei den Retina-Explantaten zeigen die dargestellten Ergebnisse die Mittelwerte der durchschnittlichen Anzahl an γ H2AX-Foci pro Chromatinregion aus 2 Färbungen unterschiedlicher Paraffinschnitte unterschiedlicher Mäuse (n=2). Die Fehlerbalken stellen die Streuung zwischen den ermittelten Einzelwerten aus 2 unabhängigen Färbungen dar.

Pulsfeldgelelektrophorese:

Bei der Pulsfeldgelelektrophorese wurden die FAR-Werte von Retina- und Gehirnexplantaten pro Gellauf ermittelt. Die dargestellten Ergebnisse zeigen den Mittelwert der FAR-Werte aus 2-3 PFGE-Durchgängen. Während der Mittelwert beim 15 min Punkt aus 2 PFGE-Durchgängen von Zellextrakten des gleichen Tieres besteht (n=1), setzt sich der Mittelwert des 8 h und 24 h Punktes aus 2 PFGE-Durchgängen von Zellextrakten des gleichen Tieres und 1 PFGE-Durchgang eines Zellextraktes eines zweiten Tieres zusammen (n=2). Die Fehlerbalken stellen die Streuung zwischen den FAR-Werten von 2-3 PFGE-Durchgängen dar.

3.2.14. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Erstmals wurde die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) zur Auftrennung von Chromosomen von *S. cerevisiae* eingesetzt^{188,189}. Die PFGE ist eine Methode zum Nachweis von DNA-Fragmenten, welche durch DNA-DSBs entstanden sind¹⁹⁰. Diese DNA-Fragmente werden innerhalb eines Agarosegels durch Anlegen eines elektrischen Feldes nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei wandern große DNA-Fragmente langsamer als kleine DNA-Fragmente. Im Gegensatz zur normalen Gelelektrophorese, bei der ein zeitlich homogenes Feld angelegt wird, wird bei der PFGE durch regelmäßige Änderung der Richtung des elektrischen Feldes eine zusätzliche Auftrennung der DNA-Fragmente erreicht, wodurch DNA-Fragment bis zu einer Größe von 10 Mbp aufgetrennt werden können. Größere Fragmente können nicht durch das Gel wandern und verbleiben in den Geltaschen. Für die PFGE werden Zellen in Agaroseblöckchen eingegossen, welche anschließend lysiert werden. Bei diesem Proteinase Verdau werden Proteine entfernt, sodass die DNA in den Blöckchen in reiner Form vorliegt. Die lysierten Blöckchen werden in die Taschen des Pulsfeld-Agarosegels eingesetzt. Die bei der PFGE aufgetrennten Fragmente können mit Hilfe eines Ethidiumbromidfarbstoffes im Gel angefärbt werden und anhand dessen Fluoreszenzsignals detektiert werden. Eine wichtige Voraussetzung für die Messung von DNA-DSBs mit dieser Methode ist die Anwendung von sehr hohen, nicht physiologischen Strahlendosen, um ausreichend DNA-Fragmente bei der Auftrennung zu erhalten. Um die DNA-Fragmente zu quantifizieren, welche in das Gel gewandert sind, wird der Quotient von aus der Tasche herausgelaufenen DNA und der Gesamt-DNA gebildet. Dieser gibt den sogenannten FAR-Wert (*fraction of radioactivity released*) an. Mit Hilfe der PFGE können sowohl initiale DNA-DSBs nach Bestrahlung in Zellen analysiert werden als auch das Reparaturverhalten in diesen Zellen.

Für die PFGE von Geweben wurden Maus-Retina-Explantate hergestellt, wie unter 3.2.9. beschrieben. Zusätzlich wurde das Gehirn der Mäuse in Scheiben geschnitten und in Medium (DMEM; 10 % FCS; 1 % L-Glutamin, 1 % NEAA; 100 Units/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Sowohl die Retina-Explantate als auch die Gehirn-Explantate wurden mit einer Dosis von 20

Gy bestrahlt (Bestrahlungsmodalitäten siehe 3.2.7.). Nach der entsprechenden Reparaturzeit wurden die Gewebe vereinzelt. Dazu wurden die Gewebe in kaltes F12 überführt. Die folgenden Angaben beziehen sich auf je 2 Retinae oder 1 Gehirn. Nach Absetzen der Gewebe wurde bei den Retinae F12 abgezogen und 2 ml warmes F12 + Trypsin (36 Units/ml) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 37 °C wurden 200 µl FCS zugegeben um die Enzymreaktion abzustoppen. Nach erneutem Absetzen der Retinae wurde die Lösung abgezogen und durch 2 ml FCS ersetzt. Die Lösung wurde verworfen und die Retinae in 1 ml HBSS aufgenommen. Anschließend wurden die Retinae durch 50 maliges Resuspendieren mit einer Pipette vereinzelt, zentrifugiert (300 g), in 200 µl PBS aufgenommen und auf Eis gelagert. Beim Gehirn wurde ebenfalls die F12 Lösung verworfen und durch eine Enzymmix-Lösung (Trypsin (90 Units/ml), Hyaluronidase (600 Units/ml), Collagenase (90 Units/ml)) ersetzt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei 37°C wurde das Gehirn durch 50 maliges Resuspendieren mit einer Pipette im Enzymmix vereinzelt und anschließend durch ein Sieb mit 40 µM Porenweite gegeben, sowie 3 ml FCS zugegeben. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (300 g), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen. Die Gewebesuspensionen wurden anschließend 1:1 mit 1,4 % Agarose Typ VII (Low melting) vermischt und in vorgekühlte Blockformen gegossen (100 µl Suspension-Agarosegemisch pro Blockchen). Da aus der Gewebevereinzeltung keine Einzelzellen resultieren wurden 0,25 Retinae und 0,05 Gehirn pro Blockchen eingesetzt. Die Blockchen wurden für 30 min bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die Blockchen in Lysepuffer transferiert und erst für 30 min bei 4°C, dann für 16 h bei 50°C gelagert. Nach der Lyse wurden die Blockchen 3-mal mit 0,5 M EDTA gewaschen. In dieser Lösung können die Blockchen monatelang bei 4°C gelagert werden.

Für die Gelelektrophorese wurde zunächst ein 0,8 %iges Agarosegel (Certified Molecular Biology Agarose in 0,5 x TBE) in einer Gelapparatur gegossen. Die lysierten Blockchen wurden für 3-mal 30 min bei 4°C in TE-Puffer gewaschen und dann ohne Luftblasen in die Taschen des Gels eingesetzt. Anschließend wurden die Taschen mit Taschenagarose (0,8 %iger Small DNA Low Melt Agarose in TE) überschichtet. Das Gel wurde in eine mit 0,5 x TBE Puffer gefüllte PFGE-Apparatur überführt und 30 min lang äquilibriert. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einem Feldwinkel von 120°, einer elektrischen Feldstärke von 1,5 V pro cm und Pulszeiten von 50-5.000 s bei 14°C für 96 h.

Nach der DNA-Auftrennung wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml Ethidiumbromid in 0,5 x TBE) überführt und im Dunklen über Nacht bei RT somit die DNA gefärbt. Danach wurde das Gel für 4 h in 0,5xTBE entfärbt. Anschließend wurde das Gel mit einem UV-Detektionsgerät (ChemiSmart 5000) aufgenommen. In der ursprünglichen PFGE wurde die DNA nicht durch Ethidiumbromid sondern durch vorherigen Einbau von ³H- oder ¹⁴C-markierten Nukleotiden in die DNA markiert. Der FAR (*Fraction of radioactivity released*)-Wert, welcher den Quotienten der aus der Tasche gelaufenen DNA und der Gesamt-DNA darstellt, wurde hierbei durch Messung der Radioaktivität bestimmt. Für die angegebenen FAR-Werte in dieser Arbeit wurden die durch Ethidiumbromid gefärbten DNA-Laufbanden mit Hilfe von ImageJ analysiert.

4. ERGEBNISSE

4.1. Auftreten von DSB-Markern in der adulten und der postnatalen Mausretina nach Röntgenbestrahlung

Die Mausretina ist ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der DSB-Reparatur in heterochromatischen DNA-Bereichen, da die Stäbchen-Photorezeptoren (Stäbchen-PRs) in der adulten Retina eine besondere Chromatinorganisation aufweisen. In den Stäbchen-PRs adulter Mäuse ist das konstitutive Heterochromatin (HC_k) in einem zentral gelegenen Chromocenter angeordnet, während das fakultative Heterochromatin (HC_f) um das zentrale Chromocenter herum organisiert ist. Die restlichen Zellen innerhalb der Retina weisen mehrere kleine Chromocenter auf.

Um zunächst das initiale Auftreten unterschiedlicher Doppelstrangbruch (DSB)-Marker in der Mausretina nach Röntgenbestrahlung zu untersuchen, wurden Wildtyp-Mäuse mit 1 Gy bestrahlt. Der Zeitraum zwischen Bestrahlung der Mäuse und Entnahme der Augen zur Fixierung betrug 15 min. Nach der Fixierung wurden die Augen in Paraffinblöcke eingebettet und Paraffinschnitte der Augen angefertigt.

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde die Chromatinorganisation in den Zellkernen der unterschiedlichen Schichten der adulten Mausretina durch Anfärben der DNA mit einem Farbstoff (DAPI), sichtbar gemacht (Abbildung 19). Während die Stäbchen-PRs in der äußeren nukleären Schicht (ONL=*outer nuclear layer*) der Retina ein zentral gelegenes Chromocenter aufweisen, sind in den Zellkernen der inneren nukleären Schicht (INL=*inner nuclear layer*) und der Ganglienzellschicht (GCL=*ganglion cell layer*) mehrere kleinere Chromocenter zu beobachten. Zur Detektion von DSBs wurden an den Paraffinschnitten Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen γ H2AX, 53BP1 und pATM durchgeführt. Nach Bestrahlung werden diese DSB-Marker in Form strahleninduzierter Foci in den Zellkernen sichtbar, wobei ein Focus je einen DSB repräsentiert⁵⁹⁻⁶¹. Zusätzlich wurden Paraffinschnitte der Retina unbestrahlter Mäuse zum Vergleich betrachtet.

Nach Bestrahlung adulter Mäuse mit 1 Gy kommt es in allen Zellkernen der Retina zur Ausbildung von γ H2AX-Foci (Abbildung 19).

Im Gegensatz dazu ist nicht in allen Zellkernen auch eine Ausbildung von 53BP1-Foci zu beobachten. Während in den Zellkernen der ONL der bestrahlten Retina keine 53BP1-Foci auftreten, ist innerhalb der INL ein zunehmender 53BP1-Gradient von der apikalen INL (in Richtung der PR) hin zur basalen INL (in Richtung der GCL) zu erkennen. In allen Zellkernen der basalen INL sind 53BP1-Foci detektierbar, während in der apikalen INL nur einzelne Zellkerne 53BP1-Foci aufweisen (Pfeil). Die restlichen Zellkerne der apikalen INL zeigen keine 53BP1-Foci. In der GCL lassen sich in allen Zellkernen 53BP1-Foci detektieren.

In den vergrößerten Bildausschnitten der γ H2AX/53BP1-Doppelfärbung ist zu erkennen, dass sich in der ONL ausschließlich γ H2AX-Foci befinden. In der INL kolokalisieren die meisten 53BP1-Foci mit den γ H2AX-Foci. Durch die geringere Anzahl an 53BP1-Foci in der apikalen INL, kommen in diesem Bereich auch weniger Kolokalisationen mit γ H2AX vor als in der basalen INL. In der GCL kolokalisieren dagegen die meisten γ H2AX-Foci mit den 53BP1-Foci und fast alle 53BP1-Foci auch mit den γ H2AX-Foci.

In der Retina von unbestrahlten Mäusen (Abbildung 19, Ktrl) sind kaum γ H2AX-Foci zu beobachten. Das 53BP1-Signal zeigt eine ungleichmäßige Verteilung. Während in den Zellkernen der ONL kein 53BP1-Signal vorhanden ist, zeigen einzelne Zellkerne der apikalen INL eine flächige Färbung gegen 53BP1. In der basalen INL, sowie in der GCL sind dagegen alle Zellkerne flächig gefärbt.

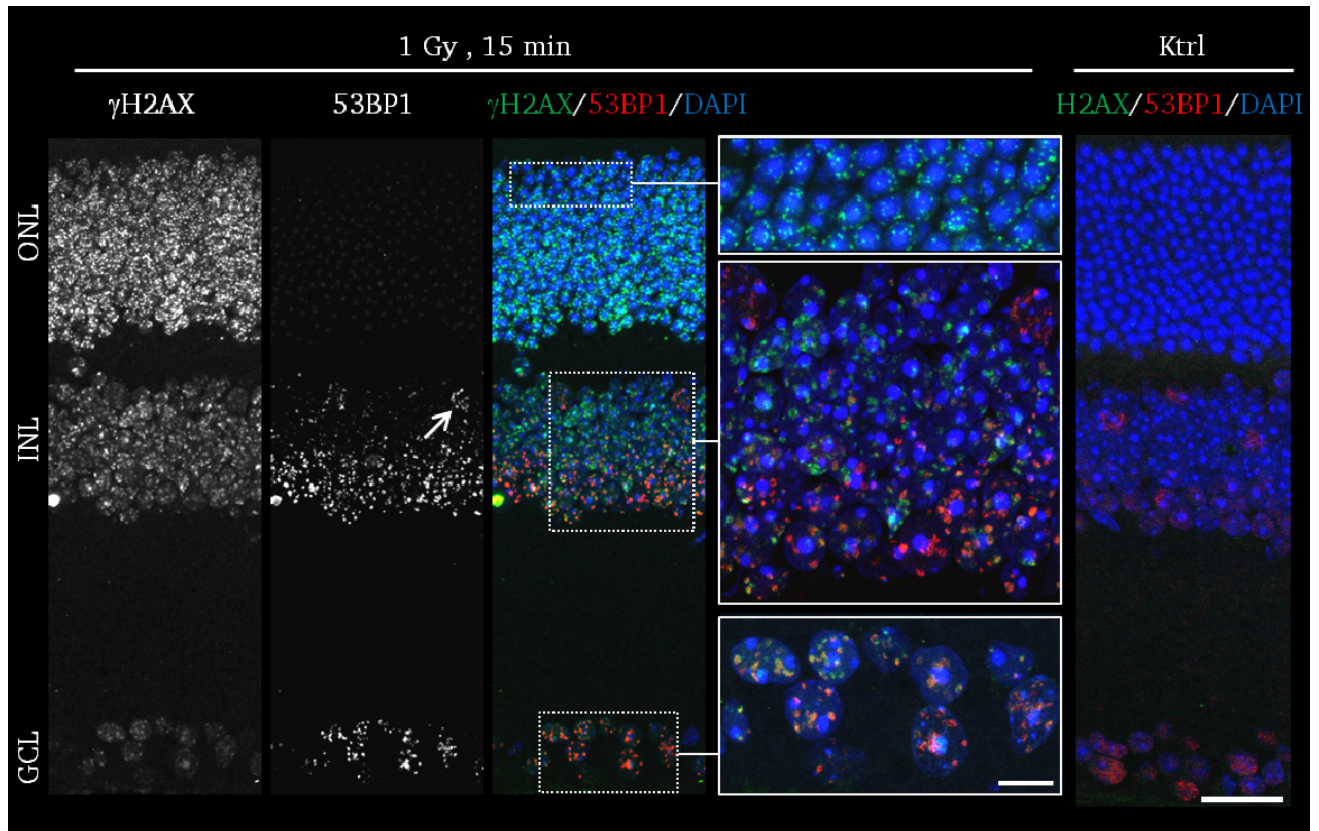


Abbildung 19: Auftreten von γ H2AX- und 53BP1-Foci in unterschiedlichen Schichten (ONL, INL und GCL) der adulten Mausretina. Immunfluoreszenzfärbung von DSB-Markern in der adulten Mausretina, mit Hilfe eines gegen γ H2AX-gerichteten Antikörpers (grün) und eines gegen 53BP1-gerichteten Antikörpers (rot), 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Zellkerne der unterschiedlichen Retinaschichten (ONL, INL und GCL) wurden mit DAPI gefärbt (blau). γ H2AX-Foci werden nach Bestrahlung in allen Schichten der Retina ausgebildet. Das Auftreten von 53BP1-Foci beschränkt sich in der apikalen INL auf einzelne Zellkerne (Pfeil). In der basalen INL und in der GCL treten in allen Zellkernen strahleninduzierte 53BP1-Foci auf. In den Vergrößerungen der unterschiedlichen Retinaschichten ist zu erkennen, dass bei der Doppelfärbung von γ H2AX und 53BP1, die meisten 53BP1-Foci mit den γ H2AX-Foci koloalisieren. In der unbestrahlten Retina (Ktrl) bilden sich kaum γ H2AX-Foci aus. Das 53BP1-Signal ist in einzelnen Zellkernen der apikalen INL, sowie in allen Zellkernen der basalen INL und GCL in Form einer flächigen Färbung sichtbar. Maßstäbe: Vergrößerung ONL, INL, GCL 10 μ m; Retinaübersichten 20 μ m.

Ein weiterer DSB-Marker ist die phosphorylierte Form der Kinase ATM (pATM). Da 53BP1 eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von pATM-Foci spielen kann, wurde eine Doppelfärbung von pATM und 53BP1 vorgenommen, wobei sich eine nahezu identische Verteilung der beiden DSB-Marker zeigt (Abbildung 20). In der ONL der bestrahlten adulten Mausretina sind keine pATM-Foci zu erkennen. Während nur in einzelnen Zellkernen der apikalen INL pATM-Foci detektierbar sind (Pfeil), weisen sämtliche Zellkerne der basalen INL pATM-Foci auf. In der GCL werden in allen Zellkernen pATM-Foci ausgebildet.

Die in der INL und GCL auftretenden pATM-Foci koloalisieren fast alle mit den 53BP1-Foci, sowie sich fast alle 53BP1-Foci auch mit den pATM-Foci überlagern. Die einzelnen Zellkerne in der apikalen INL mit pATM-Foci sind dieselben Zellkerne die auch 53BP1-Foci ausbilden.

In der unbestrahlten adulten Retina ist in allen Schichten ein schwaches Hintergrundsignal der pATM-Färbung zu sehen, jedoch sind keine pATM-Foci detektierbar.

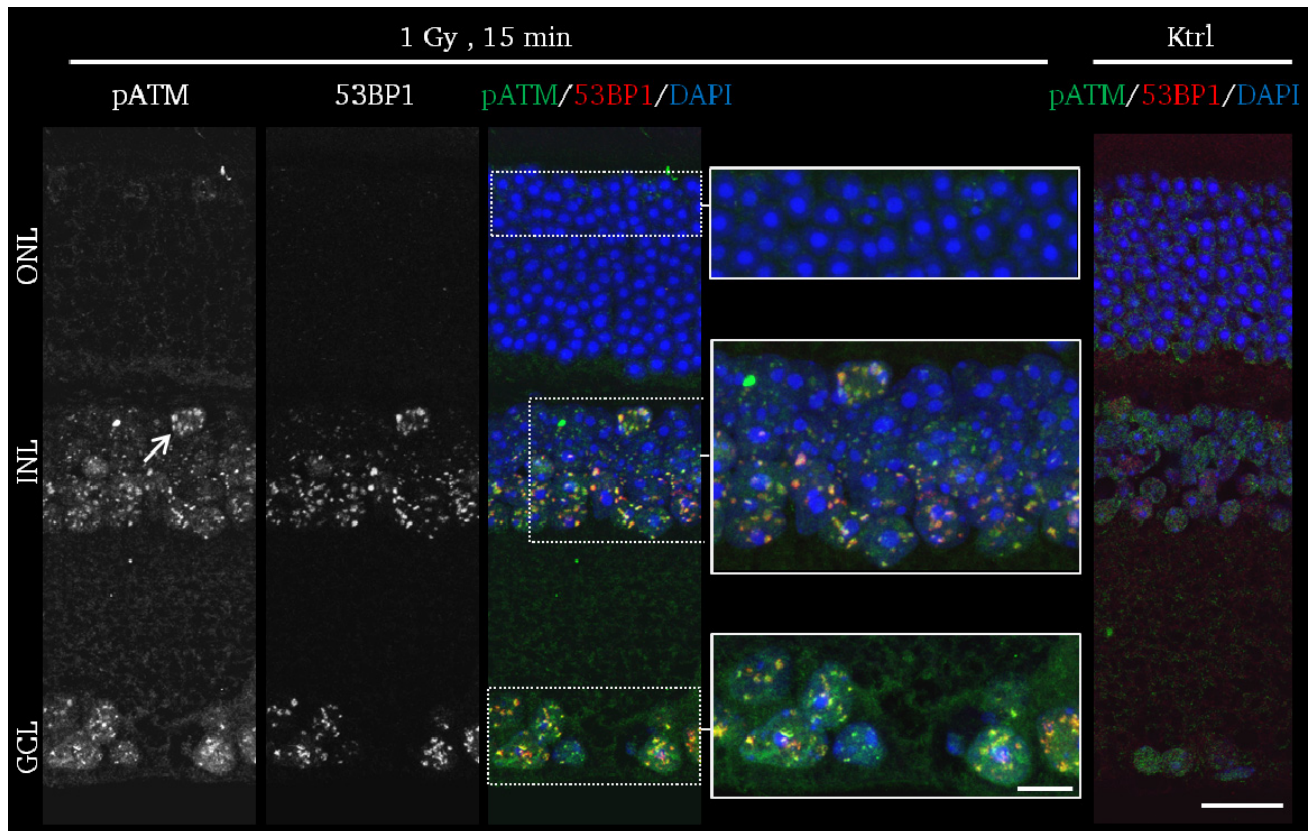


Abbildung 20: Auftreten von pATM- und 53BP1-Foci in unterschiedlichen Schichten (ONL, INL und GCL) der adulten Mausretina. Immunfluoreszenzfärbung von DSB-Markern in der adulten Mausretina, mit Hilfe eines gegen pATM-gerichteten Antikörpers (grün) und eines gegen 53BP1-gerichteten Antikörpers (rot), 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Zellkerne der unterschiedlichen Retinaschichten (ONL, INL und GCL) wurden mit DAPI gefärbt (blau). pATM-Foci bilden sich in einzelnen Zellkernen (Pfeil) der apikalen INL und in allen Zellkernen der basalen INL und der GCL aus. Das Auftreten strahleninduzierter pATM-Foci ist vergleichbar mit dem von 53BP1-Foci. In den Vergrößerungen der unterschiedlichen Retinaschichten ist zu erkennen, dass bei der Doppelfärbung von pATM und 53BP1 die meisten pATM-Foci mit den 53BP1-Foci kolokalisieren. In der unbestrahlten Retina (Ktrl) bilden sich kaum pATM-Foci aus. Das 53BP1-Signal ist in einzelnen Zellkernen der apikalen INL, sowie in allen Zellkernen der basalen INL und GCL in Form einer flächigen Färbung sichtbar. Maßstäbe: Vergrößerung ONL, INL, GCL 10 μm ; Retinaübersichten 20 μm .

Die Zellen, in denen nach Bestrahlung weder 53BP1- noch pATM-Foci ausgebildet werden, sind überwiegend in der ONL lokalisierte Photorezeptoren, mit einem zentral lokalisierten Chromocenter im Zellkern. Aus diesem Grund wurden frühere Entwicklungsstadien von Photorezeptoren auf die Ausbildung von DSB-Markern untersucht, bei denen diese besondere Chromatinorganisation noch nicht ausgebildet ist. Während der Entwicklung der Retina trennt sich die neuroblastische Schicht (NBL=*neuroblastic layer*) in die ONL, die INL und die GCL auf. Im postnatalen Stadium P4 ist mit Hilfe der DAPI-Fluoreszenzfärbung zu erkennen, dass sich die GCL bereits von der NBL getrennt hat, während die spätere ONL und INL noch in der NBL zusammengefasst werden (Abbildung 21). In diesem Stadium besitzen die bereits determinierten Photorezeptor-Vorläufer noch mehrere kleinere Chromocenter, welche erst im weiteren Entwicklungsverlauf zu einem zentralen Chromocenter fusionieren.

Wie auch in der adulten Retina, lassen sich in allen Zellkernen der gesamten P4-Retina 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy γ H2AX-Foci detektieren (Abbildung 21). Im Gegensatz zur adulten Retina sind jedoch in allen Zellkernen der P4-Retina auch 53BP1-Foci zu beobachten. Somit sind alle Vorläuferzellen der späteren ONL und INL im P4-Stadium noch in der Lage 53BP1-Foci auszubilden. Innerhalb der NBL sind die 53BP1-Foci unterschiedlich stark ausgeprägt. In der mittleren NBL befinden sich einzelne Zellkerne, welche besonders große 53BP1-Foci aufweisen (Pfeil). Erst in der unteren basalen NBL und in der GCL sind vergleichbar große Foci wieder sichtbar.

Im Hinblick auf die Kolokalisation von γ H2AX- und 53BP1-Foci ist zu erkennen, dass im Bereich der apikalen NBL, aus der sich später die ONL entwickelt, mehr γ H2AX-Foci als 53BP1-Foci auftreten. Fast alle 53BP1-Foci kolokalisieren mit den γ H2AX-Foci. Im Verlauf von der apikalen NBL zur basalen NBL, aus der sich im Zuge der Entwicklung die spätere INL bildet, nimmt die Anzahl von 53BP1-Foci, welche mit γ H2AX-Foci überlagern zu. Die großen 53BP1-Foci der bereits erwähnten Zellkerne in der mittleren NBL kolokalisieren mit den γ H2AX-Foci.

In der basalen NBL und der GCL kolokalisieren fast alle γ H2AX-Foci mit den 53BP1-Foci, sowie fast alle 53BP1-Foci auch mit den γ H2AX-Foci.

In der unbestrahlten P4-Retina sind kaum γ H2AX-Foci sichtbar. In einzelnen Zellkernen der mittleren NBL und in den Zellkernen der basalen NBL ist ein flächiges 53BP1-Signal zu erkennen. Auch alle Zellkerne der GCL weisen eine flächige 53BP1-Färbung auf.

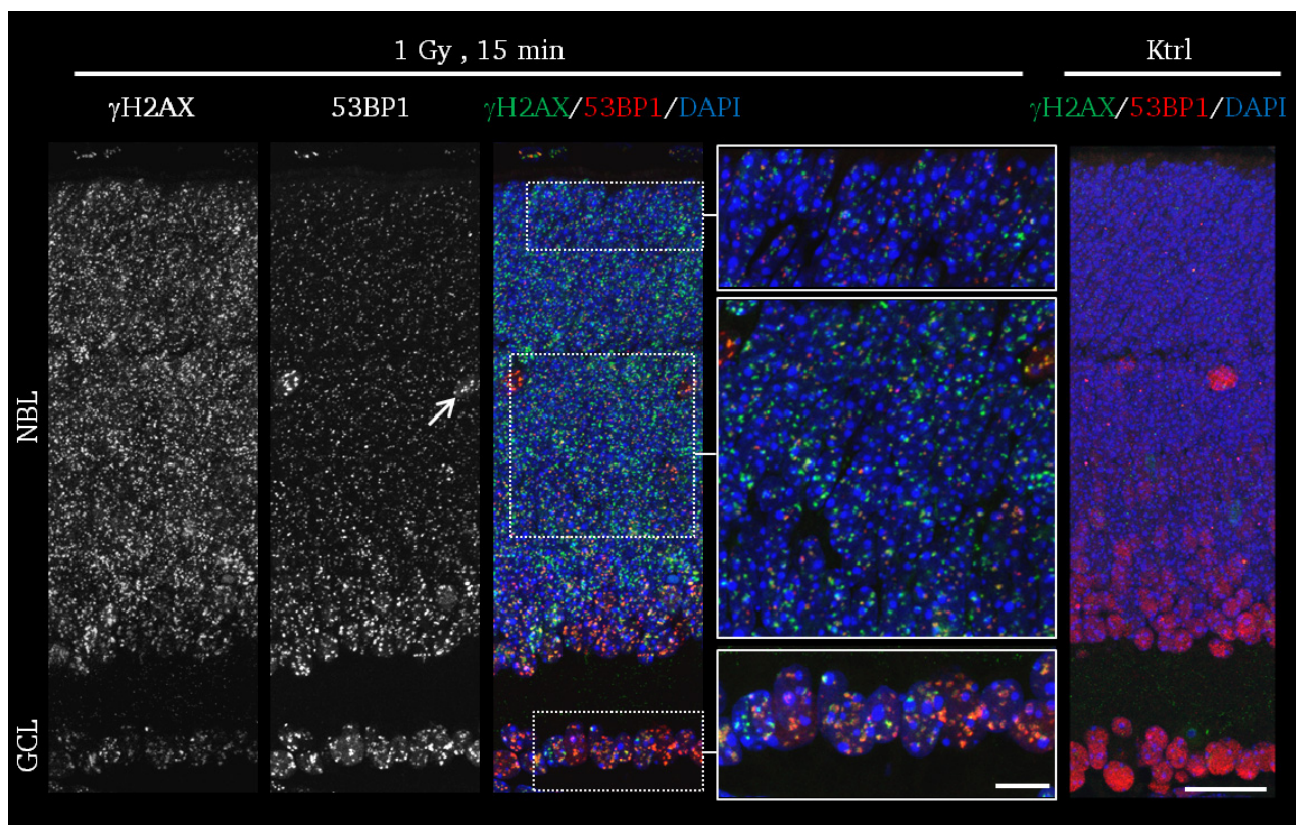


Abbildung 21: Auftreten von γ H2AX- und 53BP1-Foci in unterschiedlichen Schichten (NBL und GCL) der postnatalen Mausretina (P4). Immunfluoreszenzfärbung von DSB-Markern in der postnatalen Mausretina, mit Hilfe eines gegen γ H2AX-gerichteten Antikörpers (grün) und eines gegen 53BP1-gerichteten Antikörpers (rot), 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Zellkerne der unterschiedlichen Retinaschichten (NBL und GCL) wurden mit DAPI gefärbt (blau). γ H2AX-Foci werden nach Bestrahlung in allen Schichten der Retina ausgebildet. Auch 53BP1-Foci sind in allen Schichten detektierbar. In der mittleren NBL weisen einzelne Zellen größere 53BP1-Foci auf (Pfeil), welche erst in der basalen NBL und GCL wieder in dieser Größe zu beobachten sind. In den Vergrößerungen der unterschiedlichen Retinaschichten ist zu erkennen, dass bei der Doppelfärbung von γ H2AX und 53BP1 die meisten 53BP1-Foci mit den γ H2AX-Foci kolokalisieren. In der unbestrahlten Retina (Ktrl) bilden sich wenige γ H2AX-Foci aus. Das 53BP1-Signal ist in einzelnen Zellkernen der mittleren NBL, sowie in sämtlichen Zellkernen der basalen NBL und GCL in Form einer flächigen Färbung sichtbar. Maßstäbe: Vergrößerung NBL, GCL 10 μ m; Retinaübersichten 20 μ m.

Übereinstimmend mit dem ubiquitären Auftreten von 53BP1-Foci sind in der bestrahlten P4-Retina in allen Schichten pATM-Foci zu beobachten (Abbildung 22). Von der apikalen bis zur basalen NBL steigt die Anzahl an pATM-Foci an. In der mittleren NBL befinden sich zusätzlich einzelne Zellkerne mit größeren pATM-Foci (Pfeil). Die meisten Zellkerne der GCL besitzen pATM-Foci, jedoch treten auch einige wenige Zellen ohne pATM-Signal auf.

Beim Vergleich von pATM und 53BP1 kolokalisieren fast alle pATM-Foci mit den 53BP1-Foci, jedoch haben nicht alle 53BP1-Foci auch ein pATM-Signal, da pATM-Foci in geringerer Anzahl als 53BP1-Foci vorliegen. In der apikalen NBL treten nur wenige pATM-Foci auf, welche mit 53BP1-Foci überlagert sind. Die einzelnen Zellkerne der mittleren NBL, welche größere pATM-Foci zeigen, sind dieselben Zellkerne, welche größere 53BP1-Foci aufweisen. In der basalen NBL und der GCL befinden sich intensiv gefärbte pATM-Foci, welche zum größten Teil mit 53BP1-Foci kolokalisieren. In der unbestrahlten P4-Retina ist ein schwaches Hintergrundsignal der pATM Färbung zu sehen, jedoch keine pATM-Foci.

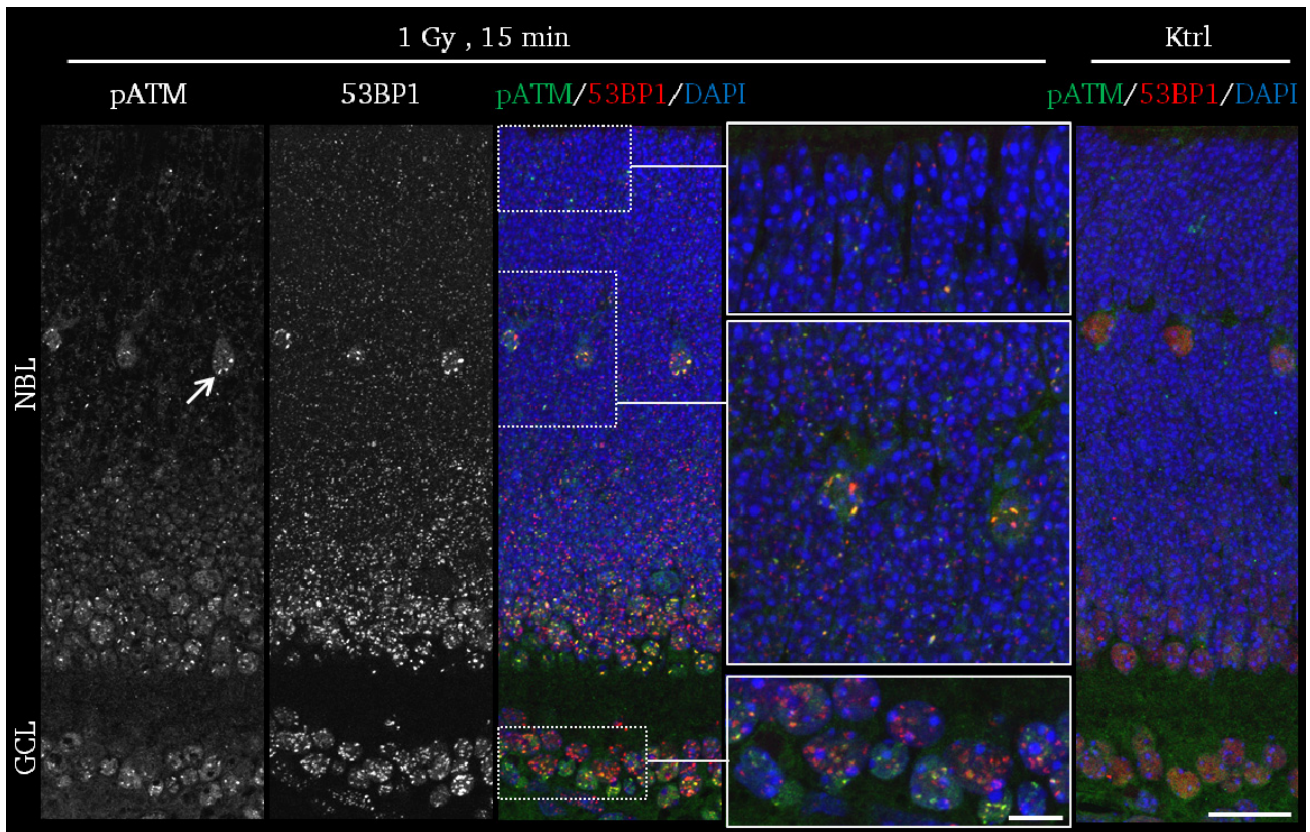


Abbildung 22: Auftreten von pATM- und 53BP1-Foci in unterschiedlichen Schichten (NBL und GCL) der postnatalen Mausretina (P4). Immunfluoreszenzfärbung von DSB-Markern in der postnatalen Mausretina, mit Hilfe eines gegen pATM-gerichteten Antikörpers (grün) und eines gegen 53BP1-gerichteten Antikörpers (rot), 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Zellkerne der unterschiedlichen Retinaschichten (NBL und GCL) wurden mit DAPI gefärbt (blau). pATM-Foci werden nach Bestrahlung in allen Schichten der Retina ausgebildet. Auch 53BP1-Foci sind in allen Schichten detektierbar. In der mittleren NBL weisen einzelne Zellen größere pATM-Foci auf (Pfeil), welche auch größere 53BP1-Foci zeigen. In den Vergrößerungen der unterschiedlichen Retinaschichten ist zu erkennen, dass bei der Doppelfärbung von pATM und 53BP1 die meisten pATM-Foci mit den 53BP1-Foci kolokalisieren. In der unbestrahlten Retina (Ktrl) bilden sich nur wenige pATM-Foci aus. Das 53BP1-Signal ist in einzelnen Zellkernen der mittleren NBL, sowie in sämtlichen Zellkernen der basalen NBL und GCL in Form einer flächigen Färbung sichtbar. Maßstäbe: Vergrößerung NBL, GCL 10 μ m; Retinaübersichten 20 μ m.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbungen von DSB-Markern konnte gezeigt werden, dass nach Bestrahlung in allen Zellkernen der adulten und postnatalen Mausretina γ H2AX-Foci ausgebildet werden. In der adulten Mausretina sind 53BP1- und pATM-Foci nur in einzelnen Zellkernen der apikalen INL, sowie in allen Zellkernen der basalen INL und der GCL zu beobachten. Die Zellen, in denen nach Bestrahlung weder 53BP1- noch pATM-Foci ausgebildet werden, sind in der adulten Mausretina überwiegend Photorezeptoren mit einem zentral lokalisiertem Chromocenter im Zellkern. Im Gegensatz dazu konnte in allen Retinaschichten der P4-Retina, in deren Zellkernen das HC noch in mehreren kleineren Chromocentern angeordnet ist, die Ausbildung von 53BP1- und pATM-Foci beobachtet werden.

4.2. Zelltyp-spezifisches Auftreten strahleninduzierter 53BP1-Foci in der INL der adulten Mausretina nach Röntgenbestrahlung

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass nicht in allen Zellkernen der adulten Retina strahleninduzierte 53BP1- (wie auch pATM-) Foci ausgebildet werden. Innerhalb der INL der adulten Retina konnte nach Bestrahlung ein von der apikalen zur basalen INL zunehmender Gradient von 53BP1-Foci festgestellt werden. Um zu untersuchen, ob das Auftreten von 53BP1-Foci auf bestimmte Zelltypen der INL begrenzt ist, wurden adulte Wildtyp-Mäuse mit 1 Gy bestrahlt und 15 min nach Bestrahlung deren Augen entnommen und fixiert. Anschließend wurden Paraffinschnitte der Augen angefertigt und mit Hilfe von Antikörpern gegen 53BP1, sowie gegen zelltypspezifische Marker (Pax6, GS, Chx10 und Lim1 + 2) für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie gefärbt.

Der Transkriptionsfaktor Pax6 spielt während der gesamten Augenentwicklung eine wichtige Rolle und kommt in der adulten Retina in Zellkernen von Amakrinzellen, Horizontalzellen und in den Zellkernen der GCL vor. Durch die Immunfluoreszenzfärbung mit einem gegen Pax6-gerichteten Antikörper werden einzelne Pax6-positive Zellkerne in der apikalen INL (Horizontalzellen) und sämtliche Zellkerne in der basalen INL (Amakrinzellen) flächig markiert (Abbildung 23, A). In den Zellkernen der Ganglienzellen zeigt sich ebenfalls ein flächiges Pax6-Signal.

In der INL weisen alle Pax6-positiven Zellkerne nach Bestrahlung 53BP1-Foci auf (Abbildung 23, B). Die in der apikalen INL liegenden Pax6-positiven Zellkerne der Horizontalzellen (Pfeil) entsprechen den im vorherigen Kapitel beschriebenen Zellen der apikalen INL, welche 53BP1-Foci ausbilden. Die Pax6-positiven Zellkerne der Amakrinzellen weisen in der basalen INL ebenfalls 53BP1-Foci auf.

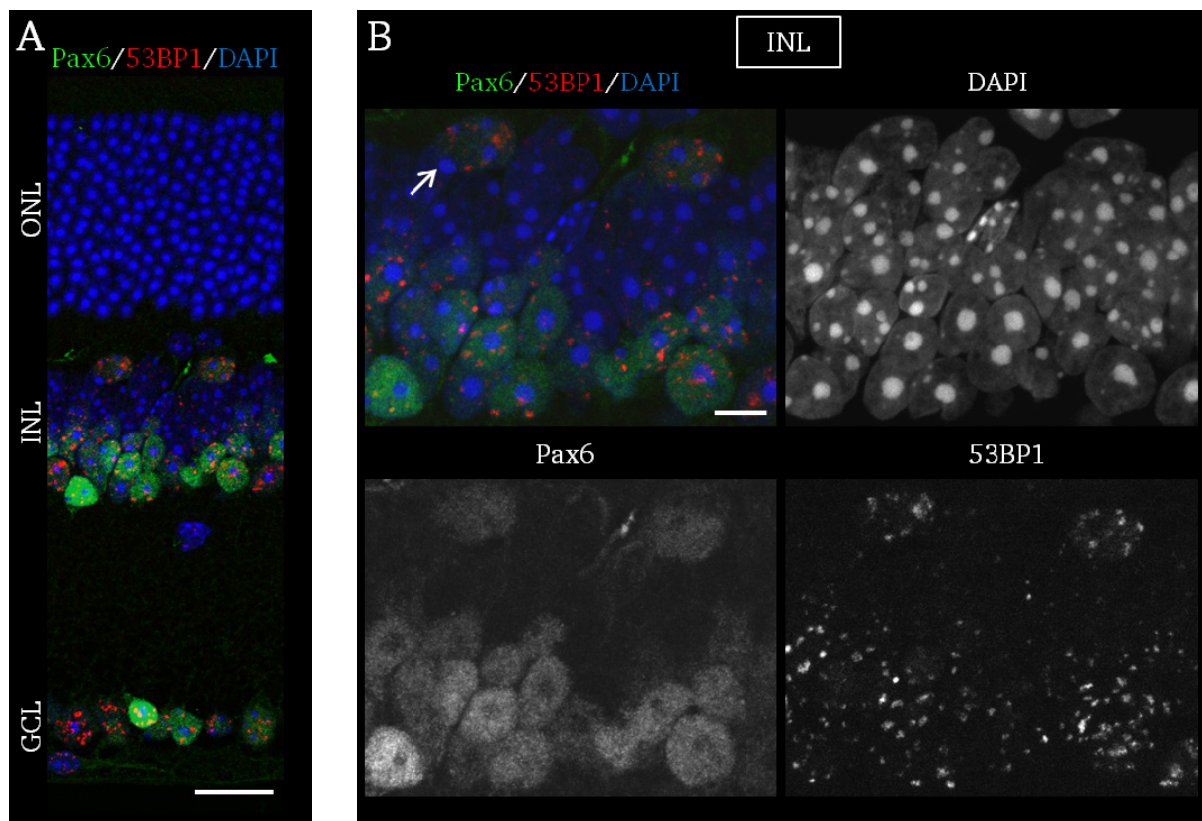


Abbildung 23: Auftreten strahleninduzierter 53BP1-Foci in Pax6-positiven Zellen der adulten Mausretina, 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy. (A) Immunfluoreszenzfärbung von Horizontal-, Amakrin- und Ganglienzellen mit einem gegen Pax6-gerichteten Antikörper (grün), sowie Markierung von DSBs mit einem gegen 53BP1-gerichteten Antikörper (rot). Die Zellkerne der unterschiedlichen Retinaschichten (ONL, INL, GCL) wurden mit DAPI gefärbt (blau). (B) Vergrößerung der INL: Die Zellkerne der Pax6-positiven Horizontalzellen (Pfeil) weisen in der apikalen INL 53BP1-Foci auf. In der basalen INL treten 53BP1-Foci in allen Zellkernen von Pax6-positiven Amakrinzellen auf. Maßstäbe: Retinaübersicht 20 μ m; Vergrößerung INL 10 μ m.

Das Enzym Glutaminsynthetase (GS) wird in der Retina ausschließlich in den Müller-Gliazellen exprimiert. Mit einem gegen GS-gerichteten Antikörper werden bei der Immunfluoreszenzfärbung sowohl die in der mittleren INL lokalisierten Zellkörper, als auch die Fortsätze der Müller-Gliazellen sichtbar (Abbildung 24, A). Die Fortsätze der GS-exprimierenden Zellen verlaufen zwischen den Photorezeptoren hindurch bis über die ONL, wo sie die äußere limitierende Membran (OLM=*outer limiting membrane*) der Retina bilden. Ebenso ziehen Fortsätze bis unter die Ganglienzellen, wo diese die innere limitierende Membran (ILM=*inner limiting membrane*) der Retina bilden. In der INL weisen alle GS-positiven Zellen (Pfeil) nach einer Bestrahlung mit 1 Gy 53BP1-Foci in den Zellkernen auf (Abbildung 24, B).

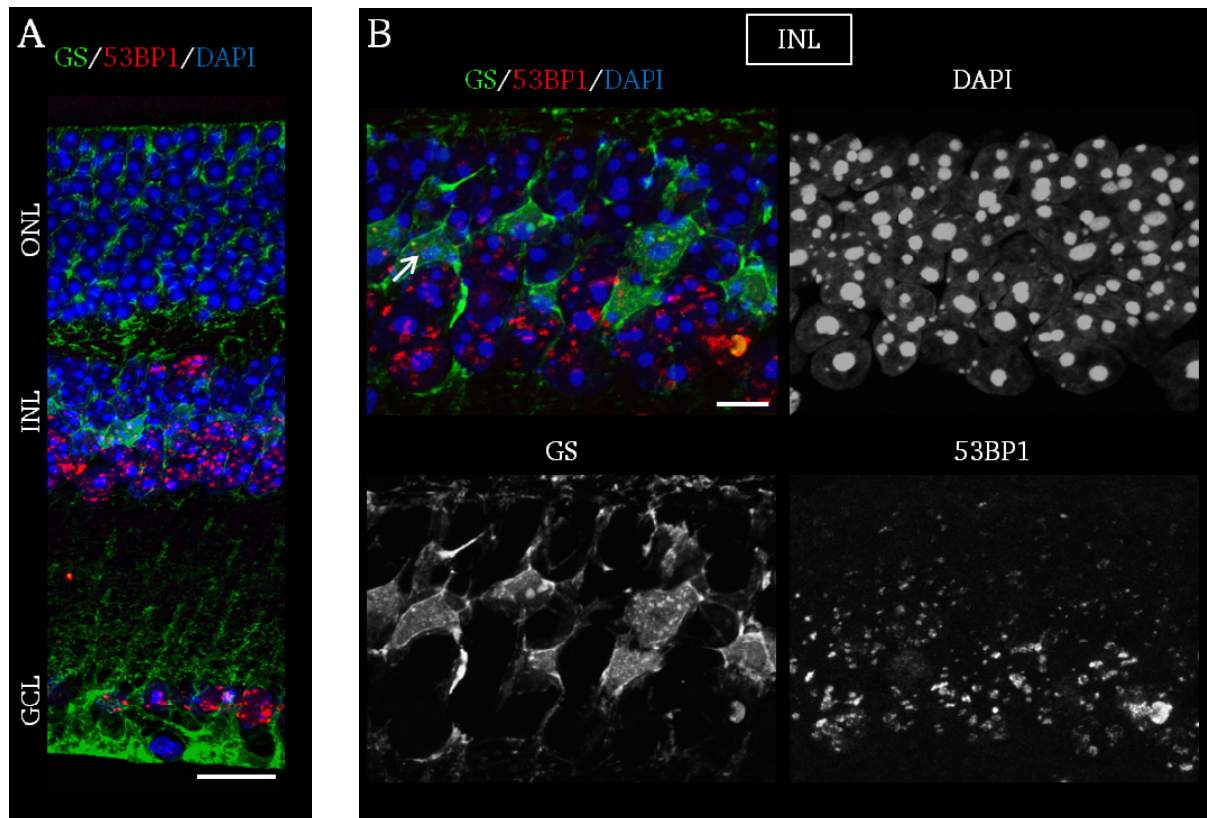


Abbildung 24: Auftreten strahleninduzierter 53BP1-Foci in Glutaminsynthetase-positiven Zellen der adulten Mausretina, 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy. (A) Immunfluoreszenzfärbung von Müller-Gliazellen mit einem gegen Glutaminsynthetase-gerichteten Antikörper (grün), sowie Markierung von DSBs mit einem gegen 53BP1-gerichteten Antikörper (rot). Die Zellkerne der unterschiedlichen Retinaschichten (ONL, INL, GCL) wurden mit DAPI gefärbt (blau). (B) Vergrößerung der INL: In allen Zellkernen von Glutaminsynthetase-positiven Müller-Gliazellen (Pfeil) sind 53BP1-Foci sichtbar. Maßstäbe: Retinaübersicht 20 μ m; Vergrößerung INL 10 μ m.

Die Expression des Transkriptionsfaktors Lim1+2 ist in der adulten Mausretina ausschließlich auf die Zellkerne der Horizontalzellen beschränkt. Durch die Immunfluoreszenzfärbung mit einem gegen Lim1+2-gerichteten Antikörper lassen sich die in der apikalen INL liegenden Zellkerne der Horizontalzellen detektieren (Abbildung 25, A). In diesen Lim1+2-positiven Zellen werden nach Bestrahlung 53BP1-Foci ausgebildet (Abbildung 25, B, Pfeil). Dieser Befund, welche auch schon mit Hilfe der Pax6-Färbung nachgewiesen wurde, unterstützt die Aussage, dass alle in der apikalen INL lokalisierten Horizontalzellen 53BP1-Foci ausbilden. Außerdem konnte beobachtet werden, dass es sich bei den Lim1+2-positiven Zellen in der bestrahlten P4-Retina, welche in der apikalen NBL große 53BP1- und pATM-Foci ausbilden, ebenfalls um Horizontalzellen handelt (nicht gezeigt).

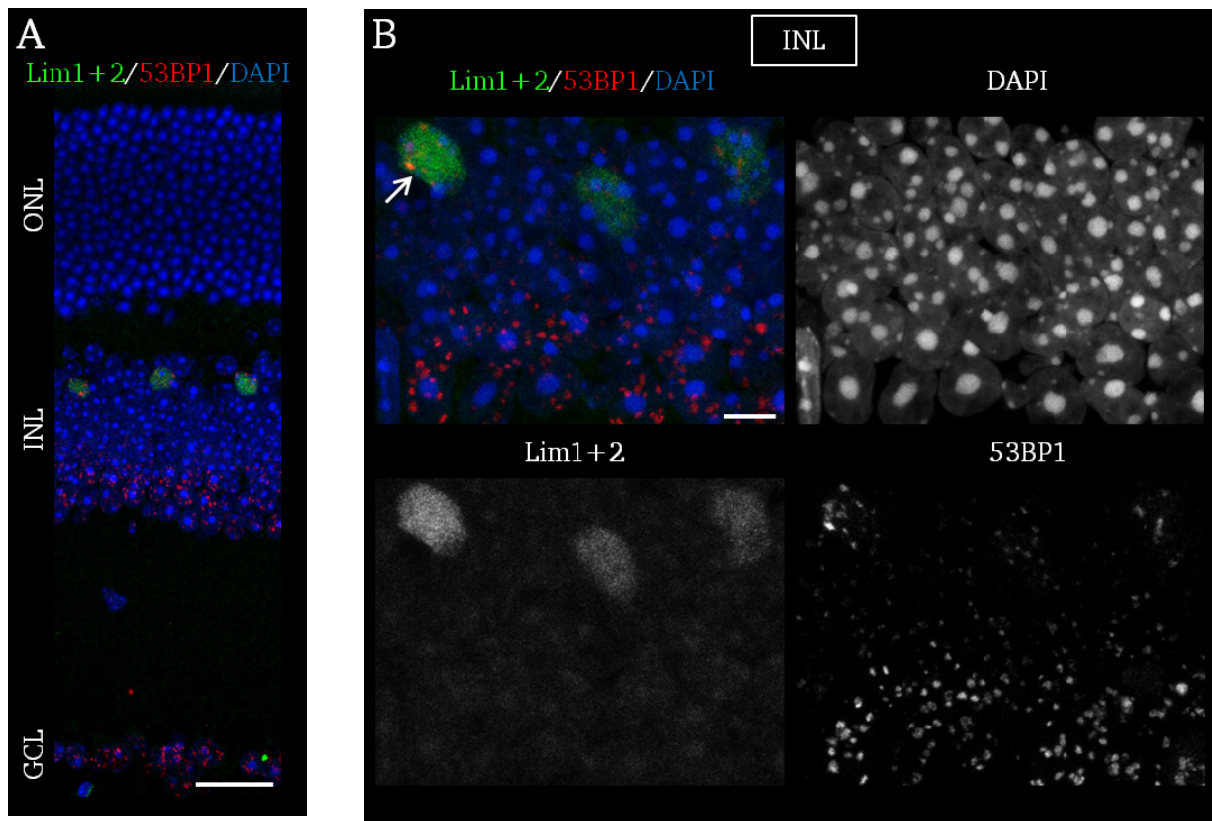


Abbildung 25: Auftreten strahleninduzierter 53BP1-Foci in Lim1+2-positiven Zellen der adulten Mausretina, 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy. (A) Immunfluoreszenzfarbung von Horizontalzellen mit einem gegen Lim1+2-gerichteten Antikörper (grün), sowie Markierung von DSBs mit einem gegen 53BP1-gerichteten Antikörper (rot). Die Zellkerne der unterschiedlichen Retinaschichten (ONL, INL, GCL) wurden mit DAPI gefärbt (blau). (B) Vergrößerung der INL: In allen Zellkernen von Lim1+2-positiven Horizontalzellen (Pfeil) sind 53BP1-Foci sichtbar. Maßstäbe: Retinaübersicht 20 µm; Vergrößerung INL 10 µm.

Der Transkriptionsfaktor Chx10 wird in der adulten Mausretina in den Zellkernen von Bipolarzellen exprimiert. Die in der apikalen INL lokalisierten Zellkörper der Bipolarzellen wurden mit Hilfe eines gegen Chx10-gerichteten Antikörper in der Immunfluoreszenzfarbung sichtbar gemacht (Abbildung 26, A). Es zeigt sich, dass in den Chx10-positiven Zellen nach Bestrahlung keine 53BP1-Foci ausgebildet werden (Abbildung 26, B).

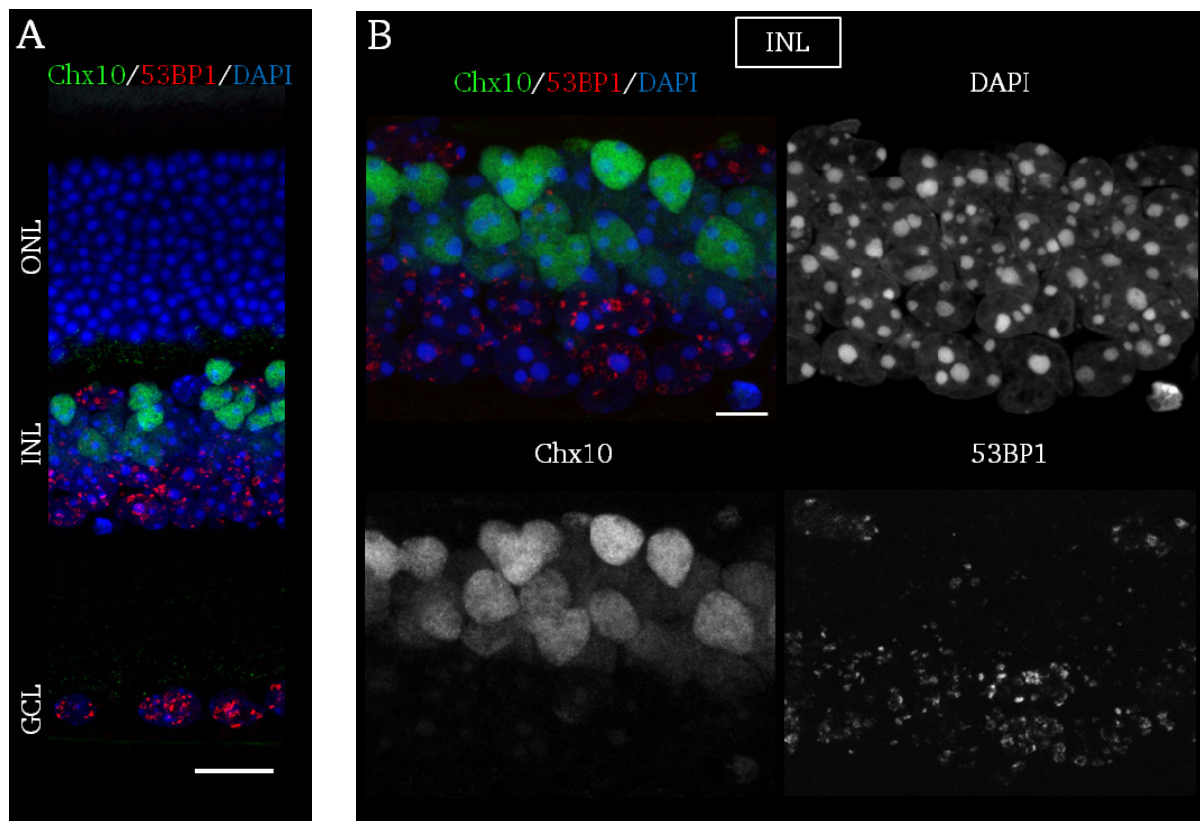


Abbildung 26: Auftreten strahleninduzierter 53BP1-Foci in Chx10-positiven Zellen der adulten Mausretina, 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy. (A) Immunfluoreszenzfärbung von Bipolarzellen mit einem gegen Chx10-gerichteten Antikörper (grün), sowie Markierung von DSBs mit einem gegen 53BP1-gerichteten Antikörper (rot). Die Zellkerne der unterschiedlichen Retinaschichten (ONL, INL, GCL) wurden mit DAPI gefärbt (blau). (B) Vergrößerung der INL: In den Zellkernen von Chx10-positiven Bipolarzellen sind keine 53BP1-Foci detektierbar. Maßstäbe: Retinaübersicht 20 μ m; Vergrößerung INL 10 μ m.

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Ausbildung von 53BP1-Foci innerhalb der INL der Mausretina auf spezifische Zelltypen begrenzt ist. Während die in der apikalen INL liegenden Bipolarzellen keine strahleninduzierten 53BP1-Foci ausbilden, sind in den restlichen Zelltypen der INL (Horizontalzellen, Müller-Gliazellen und Amakrinzellen) 53BP1-Foci nach Bestrahlung detektierbar.

4.3. Zeitlich begrenzte Ausbildung strahleninduzierter 53BP1-Foci in der ONL der adulten Mausretina nach Röntgenbestrahlung

Bei der initialen Schadensantwort konnte die Ausbildung strahleninduzierter γ H2AX-Foci in den Photorezeptoren der ONL beobachtet werden (Kapitel 4.1.). Der für die Reparatur von DSBs wichtige Faktor 53BP1 konnte 15 min nach Bestrahlung nicht detektiert werden. Es stellte sich nun die Frage, ob Reparaturproteine wie 53BP1 nur initial oder während des gesamten Reparaturverlaufs in den Stäbchen-PRs der ONL abwesend sind. Dafür wurden adulte Wildtyp-Mäuse mit 1 Gy bestrahlt und 2,5 h; 5 h und 24 h nach Bestrahlung deren Augen entnommen und fixiert. Anschließend wurden Paraffinschnitte der Augen angefertigt und mit Hilfe eines gegen γ H2AX-gerichteten Antikörpers, sowie eines gegen 53BP1-gerichteten Antikörpers Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

In den Zellen der ONL sind 2,5 h nach Bestrahlung zahlreiche γ H2AX-Foci vorhanden (Abbildung 27). Zu diesem Zeitpunkt sind ebenfalls 53BP1-Foci in der ONL zu beobachten, deren Anzahl jedoch nicht so hoch ist, wie die von γ H2AX-Foci. Auch 5 h nach Bestrahlung sind zahlreiche γ H2AX-Foci in der ONL detektierbar, deren Anzahl im Vergleich zu 2,5 h nach Bestrahlung jedoch geringer ist. Die 5 h nach Bestrahlung vorhandenen 53BP1-Foci sind scheinbar etwas schwächer verglichen mit denen nach 2,5 h. Ebenso wie 2,5 h nach Bestrahlung sind nach 5 h weniger 53BP1-Foci zu beobachten als γ H2AX-Foci. Während 24 h nach Bestrahlung eine erstaunliche Anzahl von γ H2AX-Foci in der ONL beobachtet werden konnte, sind zu dieser Zeit kaum noch 53BP1-Foci vorhanden.

Somit konnte gezeigt werden, dass der für die DSB-Reparatur wichtige Faktor 53BP1 zwar initial in den Photorezeptoren der ONL keine 53BP1-Foci ausbildet, jedoch konnte zu späteren Zeiten im Verlauf der Reparatur eine zeitlich begrenzte, gegenüber γ H2AX-Foci verminderte Ausbildung von 53BP1-Foci nachgewiesen werden.

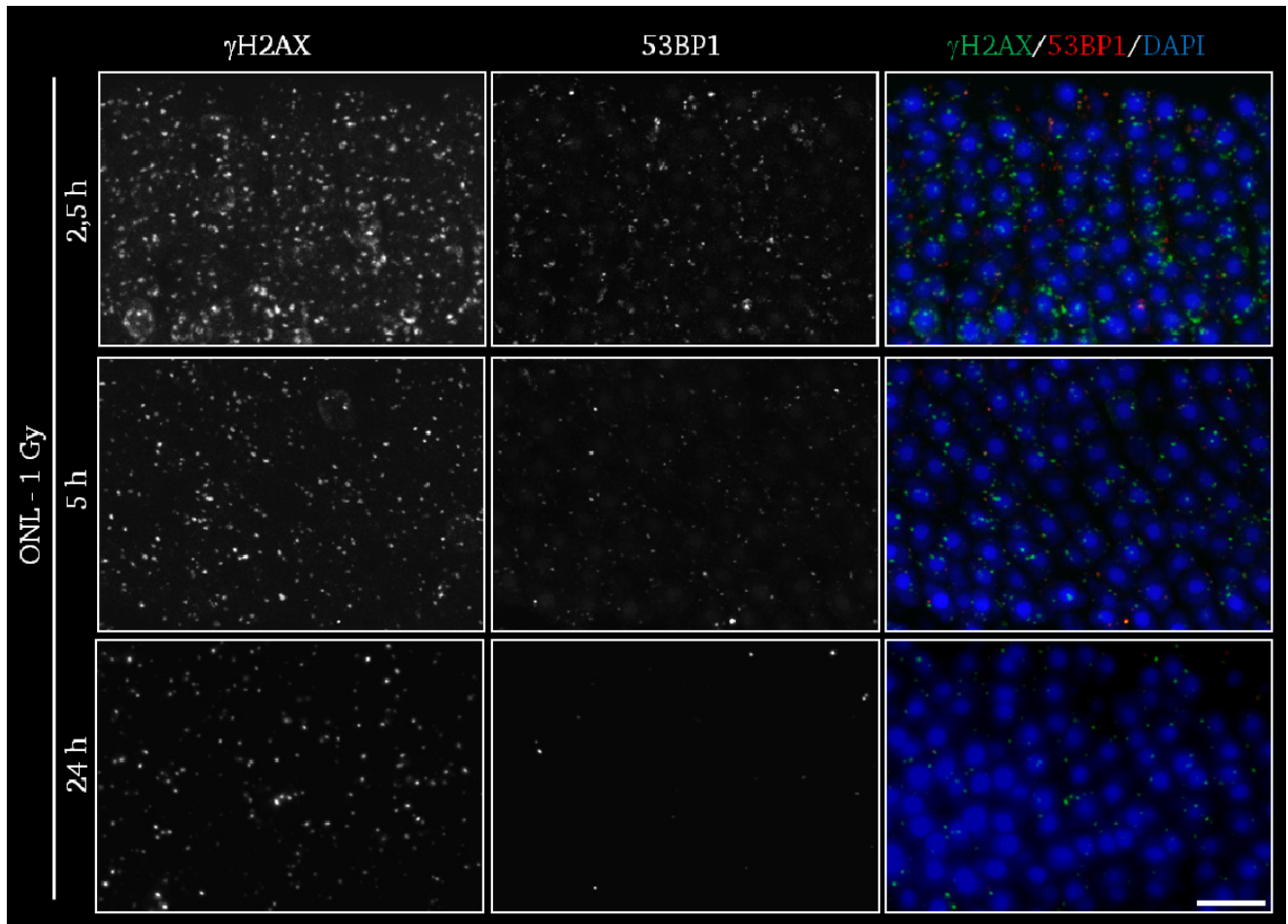


Abbildung 27: Auftreten von 53BP1-Foci in den Photorezeptoren der ONL der adulten Mausretina während der DSB-Reparatur. Immunfluoreszenzfärbung von DSB-Markern mit Hilfe eines gegen γ H2AX-gerichteten Antikörpers (grün) und eines gegen 53BP1-gerichteten Antikörpers (rot) in der adulten Mausretina 2,5 h; 5 h und 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Zellkerne der Photorezeptoren in der ONL wurden mit DAPI gefärbt (blau). In allen Zellen der ONL sind 2,5 h nach Bestrahlung zahlreiche γ H2AX-Foci vorhanden. Zu diesem Zeitpunkt sind ebenfalls 53BP1-Foci zu beobachten, deren Anzahl jedoch geringer ist als die von γ H2AX-Foci. Nach 5 h ist die Anzahl von γ H2AX-Foci weniger im Vergleich zu 2,5 h. Die 5 h nach Bestrahlung vorhandenen 53BP1-Foci scheinen etwas schwächer als die nach 2,5 h und sind im Vergleich zur Anzahl von γ H2AX-Foci zu diesem Zeitpunkt geringer. Während 24 h nach Bestrahlung verbleibende γ H2AX-Foci zu beobachten sind, können kaum noch 53BP1-Foci detektiert werden. Maßstab: 10 μ m.

4.4. DSB-Reparatur in der adulten Mausretina nach Röntgenbestrahlung

Im Kapitel 4.1. und 4.3. konnte in der adulten Retina ein unterschiedliches Auftreten von DSB-Markern nach Bestrahlung mit 1 Gy festgestellt werden. Dabei wurde beobachtet, dass initial nach Bestrahlung in allen Zellen der Retina γ H2AX-Foci nachgewiesen werden konnten. Die für die DSB-Reparatur wichtigen Faktoren 53BP1 und pATM bilden initial keine strahleninduzierten Foci in den Zellen der ONL, sowie in den Bipolarzellen der INL (Kapitel 4.1. und 4.2.) aus. Für die Zellen der ONL konnte jedoch gezeigt werden, dass 53BP1-Foci nach 2,5 h und 5 h in einer verminderten Anzahl auftreten.

Es stellte sich nun die Frage, wie sich die initial fehlende Ausbildung von 53BP1- und pATM-Foci bzw. die verminderte und zeitlich begrenzte Ausbildung von 53BP1-Foci auf die Reparatur von DSBs

auswirkt, da sowohl der *Knockout* von 53BP1, als auch der von ATM zu einer verlangsamten DSB-Reparatur führen kann^{110,115,160,191,192}. Dementsprechend wurde anschließend die DSB-Reparatur von den Zellen der adulten Retina untersucht, welche keine bzw. nur wenige strahleninduzierte 53BP1- und pATM-Foci ausbilden und mit den Zellen verglichen, in denen diese Foci vorhanden sind.

Dafür wurden adulte Wildtyp-Mäuse mit 1 Gy bestrahlt und 15 min, 24 h, 72 h und 144 h nach Bestrahlung deren Augen entnommen und fixiert. Anschließend wurden Paraffinschnitte der Augen angefertigt und mit Hilfe eines gegen γ H2AX-gerichteten Antikörpers Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Da gezeigt werden konnte, dass die Anzahl von ausgebildeten γ H2AX-Foci mit der Anzahl von DSBs im Verhältnis 1:1 korreliert⁶¹, konnte durch die Quantifizierung von γ H2AX-Foci die DSB-Reparatur analysiert werden.

Wie bereits in Kapitel 4.1. gezeigt, treten nach Bestrahlung mit 1 Gy initial (15 min) in allen Schichten (ONL, INL und GCL) der adulten Retina γ H2AX-Foci auf (Abbildung 28, A). Nach einer Reparaturzeit von 24 h sind in der ONL noch zahlreiche γ H2AX-Foci vorhanden, während in der gesamten INL, sowie in der GCL kaum noch γ H2AX-Foci detektierbar sind. Auch 72 h und 144 h nach Bestrahlung ist im Vergleich zum 24 h-Punkt, nur eine leichte Abnahme an γ H2AX-Foci in der ONL zu beobachten.

Um die Anzahl an DSBs während der Reparatur quantifizieren zu können wurde 15 min, 24 h, 72 h und 144 h nach Bestrahlung der adulten Retina mit 1 Gy die durchschnittlich auftretenden γ H2AX-Foci pro Zelle ausgewertet (Abbildung 28, B). Dabei wurde die DSB-Reparatur von Zellen der ONL mit der von Zellen der INL verglichen. Für die ONL wurden nur Stäbchen-Photorezeptoren (Stäbchen-PRs), welche zu 97 % die ONL bilden, in die Auswertung einbezogen¹⁹³. Zusätzlich wurden γ H2AX-gefärbte Zellen gleicher Zeitpunkte nach Bestrahlung aus dem Gehirn der Maus, sowie 53BP1-gefärbte Zellen aus der Niere ausgewertet und mit den Stäbchen-PRs verglichen. Die DSB-Reparatur in Zellen der Niere wurde aus technischen Gründen mit Hilfe eines gegen 53BP1-gerichteten Antikörpers untersucht, da γ H2AX- und 53BP1-Foci in der Niere der Maus fast 1:1 kolokalisieren¹⁶⁰. Bei der Auswertung wurden nur Zellen betrachtet, welche sich in der G1/G0-Phase befanden (Kapitel 3.2.10). In allen Zellen der Stäbchen-PRs, der INL, der Niere sowie des Gehirns treten 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy durchschnittlich ~ 11 γ H2AX(53BP1)-Foci pro Zelle auf. Nach 24 h verbleiben in den Stäbchen-PRs noch ~ 50 % der initialen γ H2AX-Foci ($\sim 5,5$ γ H2AX-Foci pro Zelle). Dagegen besitzen die Zellen der INL, sowie der Niere und des Gehirns nach 24 h nur noch eine durchschnittliche Anzahl von $\sim 0,7$ γ H2AX(53BP1)-Foci pro Zelle. Im weiteren Verlauf der Reparatur sind in den Stäbchen-PRs nach 72 h noch durchschnittlich ~ 4 , nach 144 h ~ 3 γ H2AX-Foci pro Zelle vorhanden. In den Zellen der INL, der Niere und des Gehirns verbleiben nach 72 h durchschnittlich $\sim 0,3$ und nach 144 h $\sim 0,2$ γ H2AX(53BP1)-Foci pro Zelle.

In den Stäbchen-PRs, welche initial nach Bestrahlung keine 53BP1- oder pATM-Foci ausbilden, konnte also eine beschränkte Fähigkeit zur Reparatur von DSBs festgestellt werden. Die Zellen der INL, zeigen im Vergleich zu den Stäbchen-PRs eine gute Reparaturfähigkeit strahleninduzierter DSBs, wobei es keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den 53BP1- bzw. pATM-negativen Bipolarzellen und den für diese Faktoren positiven Zellen gibt. Die Zellen der Niere und des Gehirns zeigen eine vergleichbare Reparatur wie die Zellen der INL.

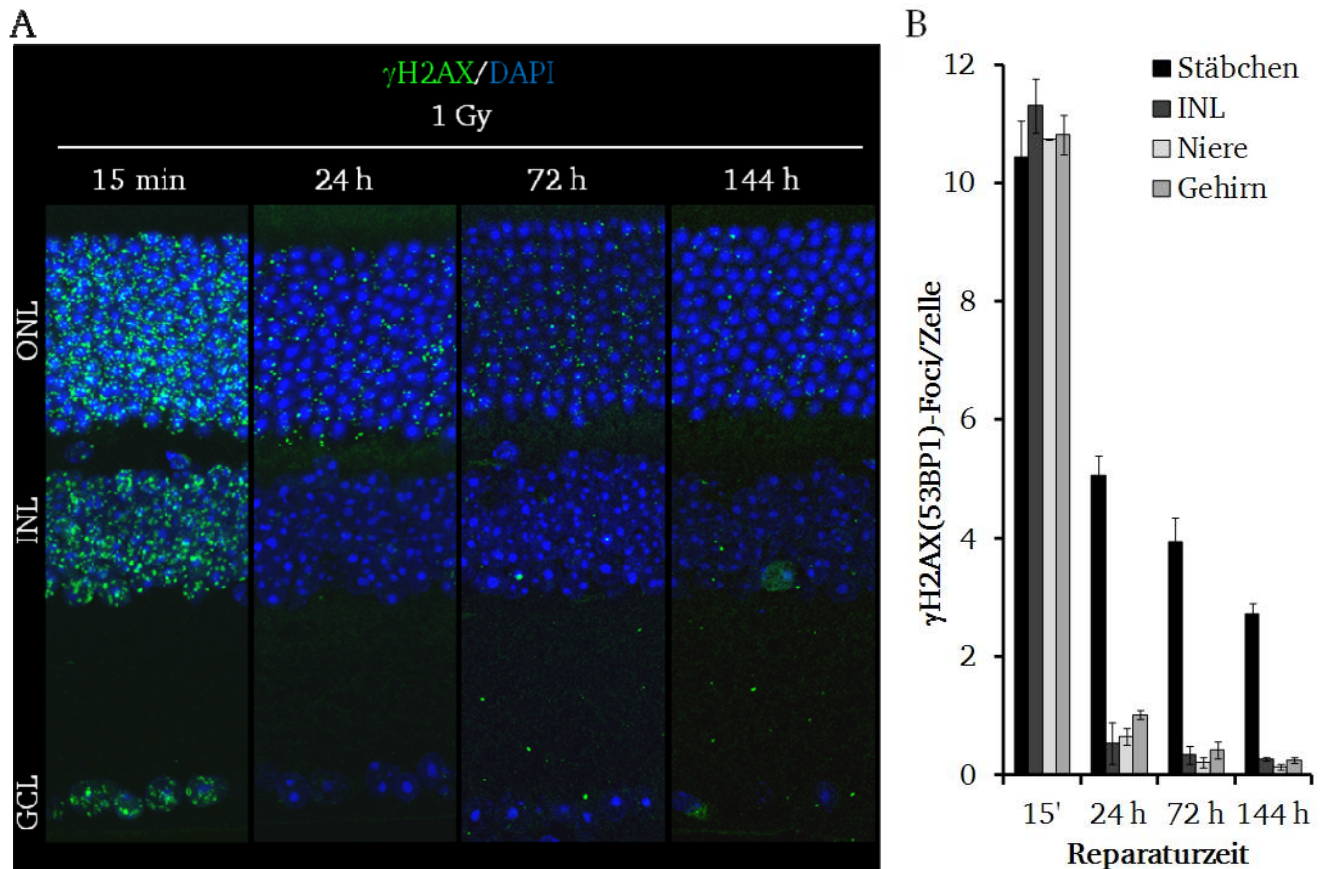


Abbildung 28: Untersuchung der DSB-Reparatur in der adulten Mausretina mittels γ H2AX(53BP1)-Foci-Analyse.

(A) Immunfluoreszenzfärbung von DSBs mit Hilfe eines gegen γ H2AX-gerichteten Antikörpers (grün) in Zellkernen unterschiedlicher Schichten der Mausretina (ONL, INL und GCL) 15 min, 24 h, 72 h und 144 h nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Zellkerne der unterschiedlichen Retinaschichten wurden mit DAPI gefärbt (blau). Während 15 min nach Bestrahlung in allen Retinaschichten zahlreiche γ H2AX-Foci auftreten, sind nach Reparaturzeiten von 24 h-144 h ausschließlich in der ONL noch γ H2AX-Foci vorhanden. Maßstab: Retinaübersicht 20 μ m. (B) Quantitative Analyse von γ H2AX-Foci pro Zelle in Stäbchen-PRs, Zellen der INL und Zellen des Gehirns bzw. von 53BP1-Foci pro Zelle in Zellen der Niere adulter Mäuse 15 min, 24 h, 72 h und 144 h nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Anzahl an strahleninduzierten γ H2AX(53BP1)-Foci ist in allen untersuchten Geweben vergleichbar. Während die Stäbchen-PRs 24 h nach Bestrahlung eine eingeschränkte Reparaturfähigkeit von durch γ H2AX-markierten DSBs aufweisen, wurden die DSBs in den anderen Geweben fast vollständig repariert. Auch nach einer Reparaturzeit von 144 h sind in den Stäbchen-PRs noch verbleibende γ H2AX-Foci detektierbar. Die Fehlerbalken stellen die Streuung zwischen den ermittelten Einzelwerten aus 2 unabhängigen Färbungen dar (n=1).

Da sich die γ H2AX-Foci-Analyse auf den Nachweis von Modifizierungen des H2AX-Proteins an den DNA-Bruchstellen beschränkt, wurde zusätzlich die Methode der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) angewandt, um die Reparatur von DSBs zu messen. Diese beruht auf dem direkten Nachweis von DNA-Fragmenten, die durch DSBs entstanden sind. Dadurch kann nachgewiesen werden, dass es sich bei den verbleibenden γ H2AX-Foci in den Stäbchen-PRs der adulten Retina nach Bestrahlung tatsächlich um DSBs handelt.

Für diese Methode wurden Mäusen die Augen entnommen und die Retinae aus den Augenbechern isoliert. Die Retina-Explantate wurden in Medium kultiviert, in diesem mit 10 oder 20 Gy bestrahlt und nach entsprechenden Reparaturzeiten wie in Kapitel 3.2.14. beschrieben für die PFGE aufbereitet. Zusätzlich wurden zu jedem Zeitpunkt Proben vom Gehirn der Maus mitgeführt, welche wie ebenfalls in Kapitel 3.2.14. beschrieben für die PFGE aufbereitet wurden. Für Retina-Explantate und für das Gehirn wurden zu jedem Zeitpunkt auch unbestrahlte Proben als Kontrolle mitgeführt.

In den unbestrahlten Retina-Explantaten (Ktrl) ist nach einer Kultivierungszeit von 15 min unterhalb der Geltasche, in dem Ethidiumbromid-gefärbten Pulsfeldgel, kaum ein Signal in der Kompressionszone zu erkennen (Abbildung 29). Dies bedeutet, dass die DNA zu diesem Zeitpunkt

keine erhöhte Anzahl an DSBs aufwies. Werden die Retina-Explantate jedoch über einen Zeitraum von 8 bzw. 24 h kultiviert, ist eine zusätzlich gefärbte Bande in der Kompressionszone zu beobachten, welche die aus dem Gel gelaufenen Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Fragmente anzeigt. Dieser Befund deutet darauf hin, dass im Laufe der Kultivierung auch ohne Bestrahlung DNA-Schäden auftreten.

Nach Bestrahlung der Retina-Explantate mit 10 Gy ist nach einer Kultivierungszeit von 15 min unterhalb der Tasche eine Bande von ins Gel gelaufenen DNA-Fragmenten zu beobachten. Bei Verdopplung der Dosis auf 20 Gy wird eine deutlich stärkere Bande in der Kompressionszone sichtbar. Nach Bestrahlung der Retina-Explantate mit einer Dosis von 20 Gy und einer Reparaturzeit von 8 h bzw. 24 h ist nur eine leichte Abnahme der Bandenstärke in der Kompressionszone, im Vergleich zum 15 min Zeitpunkt zu verzeichnen. Es werden also DSBs repariert, jedoch verbleibt ein deutlicher Restschaden in den Retina-Explantaten.

Bei den unbestrahlten Gehirn-Proben ist nach einer Kultivierungszeit von 15 min kaum ein Signal in der Kompressionszone sichtbar. Im Gegensatz zur Retina ist auch bei den 8 bzw. 24 h Kontrollen kaum ein Signal detektierbar.

Wurden die Gehirn-Proben mit 10 Gy bestrahlt, ist nach einer Kultivierungszeit von 15 min eine Bande von DNA-Fragmenten unterhalb der Tasche zu erkennen. Diese Bande wird nach einer Bestrahlung mit 20 Gy deutlich stärker. Während sich nach einer Bestrahlung des Gehirns und einer Kultivierungszeit von 8 h nur noch eine schwache Bande abzeichnet, ist diese nach einer Kultivierungszeit von 24 h fast vollständig verschwunden. Das deutet auf eine fast vollständige Reparatur der DNA im Gehirn hin.

Zur genaueren Ermittlung der Unterschiede im DSB-Reparaturverhalten von Retina-Explantaten und Gehirn-Explantaten, wurden die aus der PFGE resultierenden durchschnittlichen FAR-Werte von 2-3 Gelläufen ermittelt. Die FAR-Werte geben das Verhältnis der Fragmente, welche in das Gel gelaufen sind, im Vergleich zur Gesamt-DNA der Probe an. Bei den in Abbildung 29 dargestellten FAR-Werten der bestrahlten Proben wurden die FAR-Werte der zum Kultivierungszeitpunkt zugehörigen Kontrollen abgezogen.

Der FAR-Wert der mit 10 Gy bestrahlten Retina-Explantate liegt nach 15 min Kultivierung bei durchschnittlich 0,05, während sich der Wert vom Gehirn etwas höher bei 0,07 befindet. Nach einer Bestrahlung mit 20 Gy sind die durchschnittlichen Induktions-FAR-Werte von beiden Proben etwa doppelt so hoch wie nach 10 Gy und liegen bei etwa 0,14. Das bedeutet, dass bei doppelter Dosis doppelt so viele DNA-Fragmente erzeugt wurden. Im Verlauf der DSB-Reparatur nimmt der FAR-Wert der Retina 8 h nach Bestrahlung mit 20 Gy um etwa die Hälfte ab und zeigt somit einen durchschnittlichen FAR-Wert von 0,07, welcher etwa auf dem Level einer mit 10 Gy bestrahlten Induktionsprobe liegt. Beim Gehirn ist nach 8 h eine etwas bessere DSB-Reparatur zu erkennen, als bei den Retina-Explantaten, da sich der durchschnittliche FAR-Wert bei 0,05 befindet. Deutliche Unterschiede zwischen den beiden Geweben sind nach einer Bestrahlung mit 20 Gy und einer Reparaturzeit von 24 h zu beobachten. Während sich der FAR-Wert der Retina-Explantate im Vergleich zu 8 h kaum verändert hat (0,06), ist der vom Gehirn auf 0,02 gefallen. Das bedeutet, dass nach einer Bestrahlung mit 20 Gy und einer langen Reparaturzeit von 24 h in den Zellen der Retina eine hohe Anzahl an DNA-Fragmenten bzw. DSBs unrepariert verbleibt, während die Zellen des Gehirns eine gute Reparaturkapazität aufweisen.

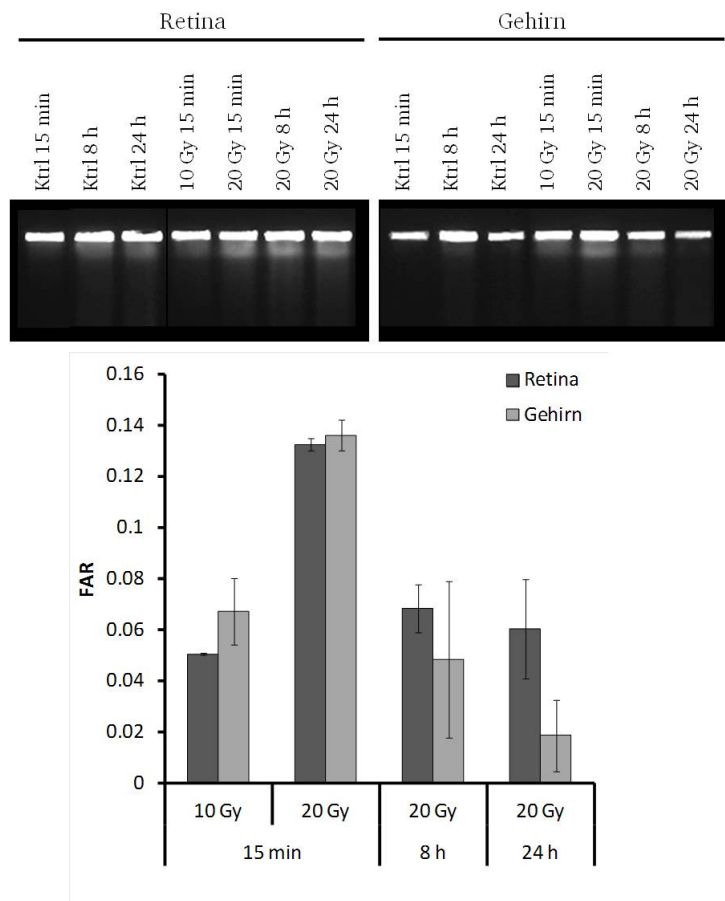


Abbildung 29: Untersuchung der DSB-Reparatur in der adulten Mausretina mittels PFGE. Ethidiumbromid-gefärbte DNA-Banden von *ex vivo* kultivierten Retina- und Gehirn-Explantaten adulter Mäuse nach Durchführung der PFGE. Die Explantate wurden mit 10 oder 20 Gy bestrahlt und nach Reparaturzeiten von 15 min, 8 h oder 24 h für die PFGE aufbereitet. Zu jedem Zeitpunkt wurden auch unbestrahlte Explantate analysiert (Ktrl). Im Laufe der Kultivierung von unbestrahlten Retina-Explantaten kommt es zur Bildung von DNA-Fragmenten, welche sich mit Hilfe der Ethidiumbromidfärbung in der Kompressionszone des Pulsfeldgels detektieren lassen. Bei Bestrahlung der Retina-Explantate mit 10 Gy werden nach 15 min DNA-Fragmente sichtbar, welche nach einer Verdopplung der Dosis auf 20 Gy ein etwa doppelt so starkes Ethidiumbromid-Signal aufweisen. Nach Reparaturzeiten von 8 h und 24 h sind die durch Ethidiumbromid gefärbten DNA-Fragmente vergleichbar mit den 15 min nach Bestrahlung mit 20 Gy auftretenden DNA-Fragmenten. Während der Kultivierung von unbestrahlten Gehirn-Explantaten entstehen kaum DNA-Fragmente. Bei Bestrahlung der Gehirn-Explantate mit 10 Gy werden nach 15 min DNA-Fragmente sichtbar, welche nach einer Verdopplung der Dosis auf 20 Gy ein etwa doppelt so starkes Ethidiumbromid-Signal aufweisen. Nach einer Reparaturzeit von 8 h ist ein deutlich schwächeres Signal zu beobachten, als 15 min nach Bestrahlung mit 20 Gy, welches nach 24 h fast vollständig verschwunden ist. Bei Berechnung der FAR-Werte, welche das Verhältnis von ins Gel gelaufenen DNA-Fragmenten zur Gesamt-DNA angeben, wurden die Werte von den unbestrahlten Proben zum jeweiligen Kultivierungszeitpunkt von den Werten der bestrahlten Proben abgezogen. Nach Bestrahlung mit 10 Gy sind die FAR-Werte in den Retina- und Gehirn-Explantaten vergleichbar und steigen nach Verdopplung der Dosis auf 20 Gy, auf doppelt so hohe Werte an. Nach Bestrahlung mit 20 Gy und einer Reparaturzeit von 8 h sind die FAR-Werte vergleichbar mit denen von 15 min nach Bestrahlung mit 10 Gy. Nach einer Reparaturzeit von 24 h sind bei den Retina-Explantaten noch vergleichbar hohe FAR-Werte zu beobachten wie nach 8 h, während die Werte von Gehirn-Explantaten stark abgenommen haben. Die Fehlerbalken stellen die Streuung zwischen den FAR-Werten von 2-3 PFGE-Durchgängen dar (n=1-2).

4.5. DSB-Reparatur in Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren der adulten Mausretina nach Röntgenbestrahlung

Wie in Kapitel 4.4. gezeigt werden konnte, besitzen die Stäbchen-Photorezeptoren (Stäbchen-PRs) sowohl gegenüber anderen Retinazellen (INL) als auch gegenüber Zellen anderer Gewebe (Niere, Gehirn) eine eingeschränkte DSB-Reparaturkapazität. Bei diesen Auswertungen wurden jedoch die Zapfen-Photorezeptoren (Zapfen-PRs) als zweiter PR-Typ der Mausretina, aufgrund ihres geringen Vorkommens in der ONL (3 % der gesamten PRs Population) noch nicht berücksichtigt. In beiden PR-

Typen konnte nach Bestrahlung keine Ausbildung von 53BP1- oder pATM-Foci beobachtet werden, welche für die Reparatur von DSBs eine wichtige Rolle spielen. Da Stäbchen-PRs eine besondere Chromatinanordnung aufweisen, welche bei den Zapfen-PRs nicht auftritt, sollte mittels γ H2AX-Analysen der Einfluss des Chromatinstatus auf die DSB-Reparatur in Stäbchen- und Zapfen-PRs genauer untersucht werden.

Dafür wurden adulte Wildtyp-Mäuse mit 1 Gy bestrahlt und 15 min und 24 h nach Bestrahlung deren Augen entnommen und fixiert. Anschließend wurden Paraffinschnitte der Augen angefertigt und mit Hilfe eines gegen γ H2AX-gerichteten Antikörpers Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die nach Bestrahlung auftretenden γ H2AX-Foci wurden mit Hilfe von Aufnahmen am Konfokalmikroskop ausgewertet und die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle bestimmt. Die beiden PR-Zelltypen wurden anhand ihrer unterschiedlichen Chromatinanordnung, die durch eine DAPI-Färbung der Zellkerne sichtbar wird, identifiziert. Während das Heterochromatin (HC) in den Stäbchen-PRs in einer großen, dicht angeordneten zentralen Chromatinstruktur (Chromocenter) lokalisiert ist, beinhalten die Zellkerne der Zapfen-PRs mehrere kleine Chromocenter (Abbildung 30, A).

Sowohl die Stäbchen-PRs als auch die Zapfen-PRs weisen 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy einen durchschnittlichen Wert von ~ 10 γ H2AX-Foci pro Zelle auf (Abbildung 30, B). Während bei den Stäbchen-PRs nach einer Reparaturzeit von 24 h ~ 5 γ H2AX-Foci pro Zelle verbleiben, zeigen die Zapfen-PRs mit ~ 1 γ H2AX-Foci pro Zelle eine gute Reparaturkapazität, welche mit anderen Geweben vergleichbar ist.

Somit konnte gezeigt werden, dass ausschließlich die Stäbchen-PRs der ONL, bei denen das HC in einem einzigen zentralen Chromocenter angeordnet ist, eine eingeschränkte Reparaturkapazität aufweisen.

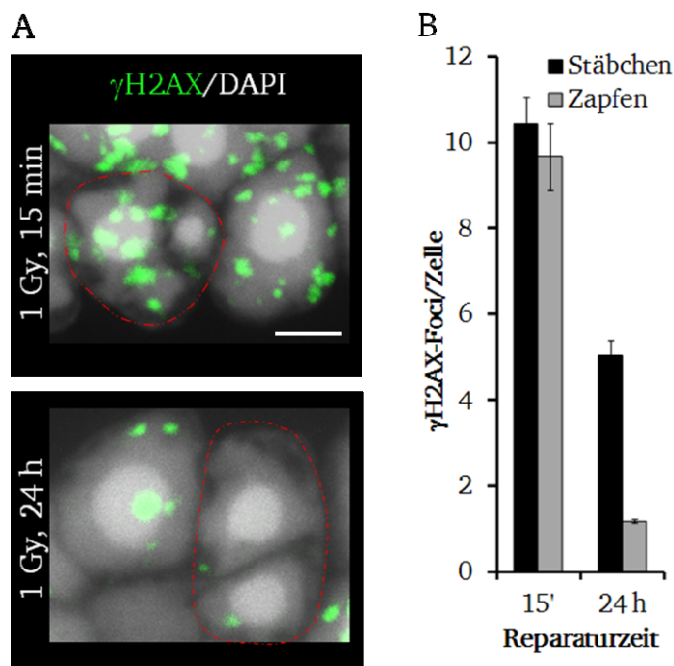


Abbildung 30: Vergleich der DSB-Reparatur in Stäbchen- und Zapfen-PRs der adulten Mausretina mittels γ H2AX-Foci Analyse. (A)

Immunfluoreszenzfärbung von DSBs mit Hilfe eines gegen γ H2AX-gerichteten Antikörpers (grün) in Zellkernen von Stäbchen- und Zapfen-PRs (Zapfen=rot umrandet) 15 min und 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Zellkerne der Stäbchen- und Zapfen-PRs wurden mit DAPI gefärbt (grau). Während 15 min nach Bestrahlung in Stäbchen- und Zapfen-PRs eine vergleichbare Anzahl von γ H2AX-Foci auftritt, verbleiben 24 h nach Bestrahlung in Stäbchen-PRs mehr γ H2AX-Foci als in Zapfen-PRs. Maßstab: 2 μ m. (B) Quantitative Analyse von γ H2AX-Foci pro Zelle in Stäbchen- und Zapfen-PRs, 15 min und 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Anzahl an strahleninduzierten γ H2AX-Foci ist in Stäbchen- und Zapfen-PRs vergleichbar. Während die Stäbchen-PRs 24 h nach Bestrahlung eine eingeschränkte Reparaturfähigkeit von, durch γ H2AX markierten, DSBs aufweisen, wurden die DSBs in den Zapfen-PRs fast vollständig repariert. Die Fehlerbalken stellen die Streuung zwischen den ermittelten Einzelwerten aus 2 unabhängigen Färbungen dar (n=1).

4.6. DSB-Reparatur in Stäbchen-Photorezeptoren der postnatalen Mausretina nach Röntgenbestrahlung

Bei der Untersuchung des DSB-Reparaturverhalten von Photorezeptoren der adulten Mausretina konnte gezeigt werden, dass lediglich die stark heterochromatischen Stäbchen-Photorezeptoren (Stäbchen-PRs) eine eingeschränkte Fähigkeit zur Reparatur von DSBs aufweisen. Um die Rolle des

Chromatinstatus in diesem Phänomen genauer zu untersuchen, wurde nun die Reparatur in noch nicht vollständig ausdifferenzierten Stäbchen-PRs-Vorläufern von P4-Mäusen analysiert. In den Zellkernen dieser Vorläufer sind noch mehrere kleine Chromocenter zu finden, welche erst im Verlauf der weiteren Entwicklung zu einem großen Chromocenter pro Zellkern fusionieren. Im Kapitel 4.1. konnte gezeigt werden, dass Stäbchen-PR-Vorläufer im P4 Stadium noch strahleninduzierte 53BP1- und pATM-Foci ausbilden, während in den Stäbchen-PRs der adulten Retina keine 53BP1- und pATM-Foci mehr auftreten. Für die Analyse wurden Wildtyp-Mäuse im Entwicklungsstadium P4 mit 1 Gy bestrahlt und 15 min und 24 h nach Bestrahlung deren Augen entnommen und fixiert. Anschließend wurden Paraffinschnitte der Augen angefertigt und mit Hilfe eines gegen γ H2AX-gerichteten Antikörpers Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die nach Bestrahlung auftretenden γ H2AX-Foci wurden mit Hilfe von Aufnahmen am Konfokalmikroskop ausgewertet und die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle bestimmt.

Da in der apikalen und mittleren NBL der P4-Retina noch proliferierende Zellen vorhanden sind, welche in der Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki67 sichtbar gemacht werden können (Abbildung 31), wurde für die Auswertung der Reparatur in den Stäbchen-PR-Vorläufern eine zusätzliche Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt, welche mit Hilfe des Antikörpers CERN901 (C901) das Stäbchen-PR-spezifische Rhodopsin markiert (Abbildung 32, A).

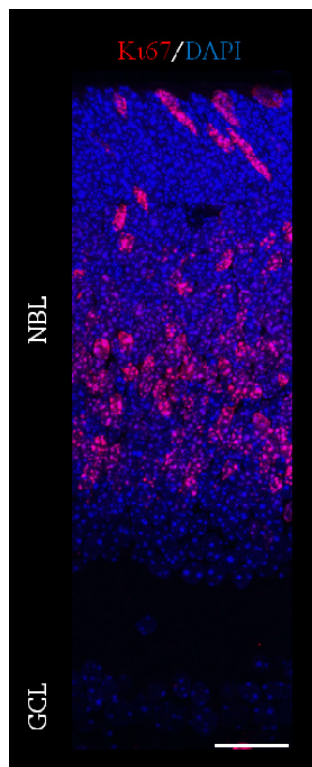


Abbildung 31: Vorkommen von proliferierenden Zellen in der postnatalen Mausretina (P4). Immunfluoreszenzfärbung von proliferierenden Zellen mit Hilfe eines gegen Ki67-gerichteten Antikörpers (rot) in Zellkernen der postnatalen Mausretina, 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). In der postnatalen Retina (P4) können proliferierende Zellen vereinzelt in der apikalen NBL, sowie vermehrt in der mittleren NBL nachgewiesen werden. Maßstab: 20 μ m.

In den C901-positiven Stäbchen-PR-Vorläufern werden im P4-Stadium 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy durchschnittlich $\sim 9,5$ γ H2AX-Foci pro Zelle induziert (Abbildung 32, B). Diese Anzahl ist vergleichbar mit der Induktion von γ H2AX-Foci in den adulten Stäbchen-PRs. Nach einer Reparaturzeit von 24 h wurden in den Stäbchen-PR-Vorläufern jedoch annähernd alle, durch γ H2AX markierte, DSBs repariert (0,5 γ H2AX-Foci pro Zelle). Dieses Reparaturverhalten ist vergleichbar mit dem adulter Zapfen-PRs, sowie mit dem von anderen adulten Geweben (INL, Niere, Gehirn). Im Gegensatz zu der eingeschränkten Reparaturfähigkeit von DSBs, welche bei adulten Stäbchen-PRs zu finden ist, zeigen die Stäbchen-PR-Vorläufer also eine gute Reparaturfähigkeit von DSBs.

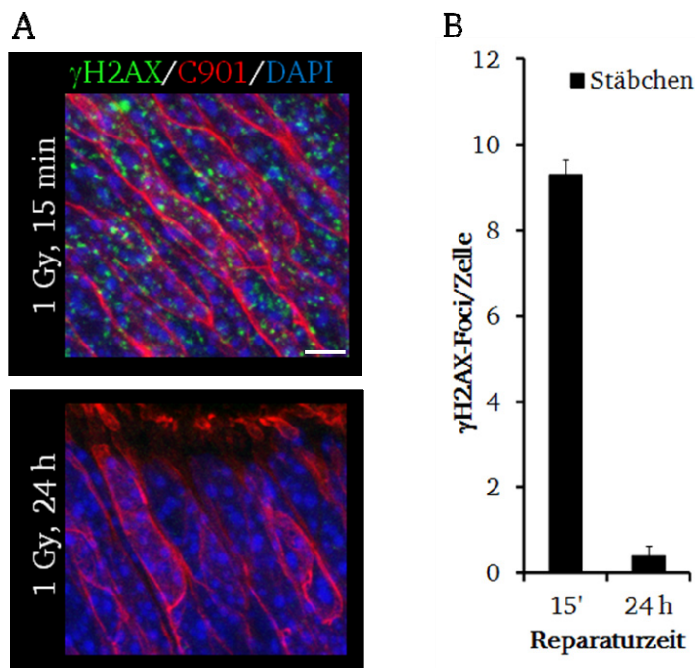


Abbildung 32: Untersuchung der DSB-Reparatur in Stäbchen-PRs-Vorläufern der postnatalen Mausretina (P4) mittels γ H2AX-Foci Analyse. (A) Immunfluoreszenzfärbung von DSBs mit Hilfe eines gegen γ H2AX-gerichteten Antikörpers (grün) in Zellkernen postnataler Stäbchen-PR-Vorläufer 15 min und 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Stäbchen-PR-Vorläufer wurden mit Hilfe eines gegen Rhodopsin-gerichteten Antikörpers CERN901 (C901) markiert (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). In den Zellkernen von Stäbchen-PR-Vorläufern werden 15 min nach Bestrahlung zahlreiche γ H2AX-Foci induziert, welche nach einer Reparaturzeit von 24 h fast vollständig verschwunden sind. Maßstab: 5 μ m. (B) Quantitative Analyse von γ H2AX-Foci pro Zelle in Stäbchen-PR-Vorläufern, 15 min und 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Anzahl an strahleninduzierten γ H2AX-Foci in den Stäbchen-PR-Vorläufern ist vergleichbar mit der adulten Stäbchen-PRs. Während in den adulten Stäbchen-PRs jedoch 24 h nach Bestrahlung noch verbleibende γ H2AX-Foci zu beobachten waren, konnten in den Stäbchen-PR-Vorläufern fast keine γ H2AX-Foci mehr ermittelt werden. Die Fehlerbalken stellen die Streuung zwischen den ermittelten Einzelwerten aus 2 unabhängigen Färbungen dar (n=1).

4.7. Einfluss von ATM und DNA-PK auf die Reparatur von DSBs in der adulten Mausretina nach Röntgenbestrahlung

Wie in Kapitel 4.1. und 4.2. gezeigt werden konnte, bilden sich in den Stäbchen- und Zapfen-PRs, sowie in den Bipolarzellen der adulten Mausretina 15 min nach Bestrahlung keine 53BP1- oder pATM-Foci aus. Allerdings konnte lediglich in den Stäbchen-PRs eine beschränkte DSB-Reparaturfähigkeit nachgewiesen werden. Da Stäbchen-PRs eine besondere Chromatinstruktur aufweisen, bei der das Heterochromatin (HC) in einem einzigen zentral lokalisierten Chromocenter angeordnet ist, und sowohl 53BP1 als auch pATM eine besondere Rolle bei der Reparatur heterochromatischer DSBs zugeschrieben wird^{109,110,115}, wurde nun die Reparatur in den Stäbchen-PRs von Wildtyp-Mäusen (WT) mit der von ATM-Mutanten (AT) verglichen. Des Weiteren wurde die Reparatur von Stäbchen-PRs in DNA-PK-defizienten Mäusen (SCID) untersucht. DNA-PK ist neben der phosphorylierten Form von ATM (pATM) die einzige Kinase welche in postmitotischen Zellen zur strahleninduzierten Phosphorylierung von H2AX beiträgt¹⁹⁴. Deshalb können durch die Untersuchung der Reparatur in der Mausretina von SCID-Mäusen, genauere Aussagen über ein tatsächliches Fehlen von pATM in den Stäbchen-PRs der adulten Maus getroffen werden: Im Falle einer strahleninduzierten Phosphorylierung von H2AX muss es in diesen Zellen entweder eine weitere H2AX-phosphorylierende Kinase, oder aber eine Restaktivität von pATM geben.

Die resultierenden Befunde für die Stäbchen-PRs wurden anschließend mit denen von Zapfen-PRs, Zellen der INL, sowie Zellen der Niere von WT-, AT- und SCID Mäusen verglichen.

4.7.1. Untersuchung der ATM- und DNA-PK-abhängigen DSB-Reparatur in Stäbchen-Photorezeptoren der adulten Mausretina

Wie schon in Kapitel 4.4. gezeigt werden konnte, werden in den Stäbchen-PRs von WT-Mäusen durchschnittlich ~ 10 γ H2AX-Foci pro Zelle induziert (5 min; 15 min) (Abbildung 33). Im Verlauf der Reparatur (30 min; 2,5 h; 5 h) ist eine kontinuierliche Abnahme von γ H2AX-Foci pro Zelle zu beobachten. Nach einer Reparaturzeit von 24 h verbleiben ~ 50 % der induzierten γ H2AX-Foci pro

Zelle. Auch 72 h nach Bestrahlung ist im Vergleich zum 24 h-Zeitpunkt kaum eine zusätzliche Reparatur zu erkennen, da immer noch ~ 4 γ H2AX-Foci pro Zelle vorhanden sind.

In den Stäbchen-PRs von AT-Mäusen werden 5 min nach Bestrahlung im Vergleich zum WT nur durchschnittlich $\sim 50\%$ ($\sim 5,5$) der γ H2AX-Foci pro Zelle induziert. Bis zum Zeitpunkt von 30 min steigt die Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle leicht an ($\sim 7,5$), liegt jedoch unter dem Wert des WT. Ab einem Zeitpunkt von 2,5 h ist die Reparatur von, durch γ H2AX-markierten, DSBs in den Stäbchen-PRs der AT Mäuse vergleichbar mit der des WT. Lediglich 72 h nach Bestrahlung weisen die Stäbchen-PRs der AT-Mäuse einen leicht erhöhten Wert im Vergleich mit dem WT auf.

In den Stäbchen-PRs von SCID-Mäusen kommt es nach Bestrahlung (5 und 15 min) zur Ausbildung von γ H2AX-Foci, deren Anzahl mit 8,5 zwischen denen von WT- und AT-Mäusen liegt. Bis zu einem Zeitpunkt von 30 min steigt die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle auf ein Maximum an (~ 11). Im Verlauf der Reparatur nimmt die Anzahl an γ H2AX-Foci ab, jedoch bleiben deutlich mehr DSBs unrepariert, als bei WT- und AT-Mäusen. Nach einer Reparaturzeit von 72 h sind durchschnittlich noch ~ 7 γ H2AX-Foci pro Zelle vorhanden.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die eingeschränkte Reparatur von DSBs in den Stäbchen-PRs von WT-Mäusen mit dem Reparaturdefekt in AT-Mäusen vergleichbar ist, obwohl die Analyse der frühen Zeitpunkte in den AT-Mäusen und die in SCID-Mäusen auftretende Phosphorylierung von H2AX nach Bestrahlung, auf das Vorhandensein und die Funktionalität von pATM in den Stäbchen-PRs von WT-Mäusen hinweist.

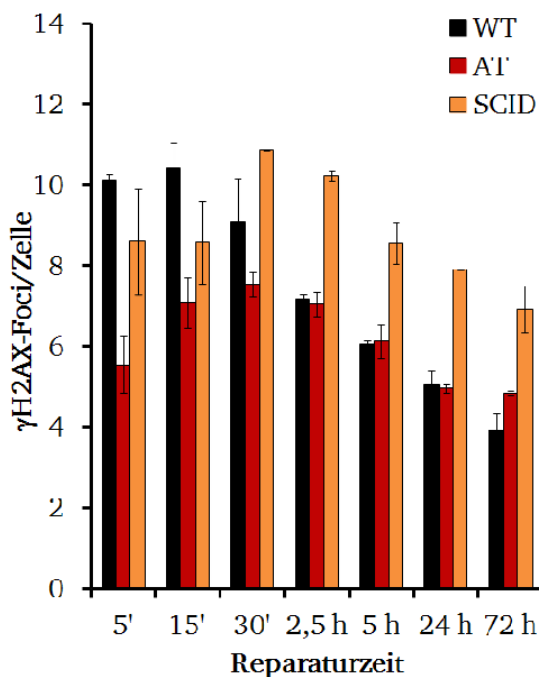


Abbildung 33: Untersuchung der ATM- und DNA-PK-abhängigen DSB-Reparatur in Stäbchen-PRs von WT-, AT- und SCID-Mäusen mittels γ H2AX-Foci Analyse. Quantitative Analyse von γ H2AX-Foci pro Zelle in Stäbchen-PRs von WT-, AT- und SCID-Mäusen 5 min; 15 min; 30 min; 2,5 h; 5 h; 24 h und 72 h nach Bestrahlung mit 1 Gy. Nach Reparaturzeiten von 24 h bzw. 72 h konnten in Stäbchen-PRs von WT-Mäusen noch $\sim 50\%$ der strahleninduzierten γ H2AX-Foci nachgewiesen werden. In den Stäbchen-PRs von AT-Mäusen konnte eine verminderte Ausbildung von γ H2AX-Foci zu frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung gegenüber WT-Mäusen festgestellt werden, wobei nach späteren Reparaturzeiten vergleichbar viele γ H2AX-Foci verbleiben wie bei WT-Mäusen. Bei SCID-Mäusen verbleiben in den Stäbchen-PRs nach späteren Reparaturzeiten deutlich mehr γ H2AX-Foci als bei WT- und AT-Mäusen. Die Fehlerbalken stellen die Streuung zwischen den ermittelten Einzelwerten aus 2 unabhängigen Färbungen dar (n=1).

4.7.2. Vergleich der ATM- und DNA-PK-abhängigen DSB-Reparatur in Stäbchen-Photorezeptoren der adulten Mausretina mit anderen Maus-Gewebezelltypen

Um die DSB-Reparatur von Stäbchen-PRs in WT-, AT- und SCID Mäusen mit der von Zapfen-PRs, Zellen der INL und Zellen der Niere vergleichen zu können, wurden WT-, AT- und SCID-Mäuse mit 1 Gy bestrahlt. Nach Reparaturzeiten von 5 min; 15 min; 30 min; 2,5 h; 5 h; 24 h und 72 h wurden den Mäusen die Augen und die Nieren entnommen, fixiert und anschließend Paraffinschnitte der Augen und der Nieren angefertigt. Mit Hilfe eines gegen γ H2AX-gerichteten Antikörpers wurden Immunfluoreszenzfärbungen an den Paraffinschnitten der Augen durchgeführt. Die DSB-Reparatur der Niere wurde mit Hilfe eines gegen 53BP1-gerichteten Antikörpers untersucht, da γ H2AX- und 53BP1-Foci in der Niere der Maus fast 1:1 kolokalisieren¹⁶⁰. Die nach Bestrahlung auftretenden γ H2AX- bzw.

53BP1-Foci wurden mit Hilfe von Aufnahmen am Konfokalmikroskop ausgewertet und die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX- bzw. 53BP1-Foci pro Zelle bestimmt.

Im Vergleich zu den mit 1 Gy bestrahlten Stäbchen-PRs von WT-Mäusen, werden sowohl in den Zapfen-PRs (Abbildung 34, A), in den Zellen der INL (Abbildung 34, B) als auch in den Zellen der Niere (Abbildung 34, C) etwa gleich viele γ H2AX- bzw. 53BP1-Foci pro Zelle induziert (~ 10). In all diesen Zelltypen von WT-Mäusen ist im Gegensatz zu den Stäbchen-PRs von WT-Mäusen eine annähernd vollständige Reparatur von γ H2AX- bzw. 53BP1-Foci nach 24 h bzw. 72 h zu beobachten.

In allen untersuchten Zelltypen von AT-Mäusen werden, wie auch bei den Stäbchen-PRs, vergleichsweise etwas weniger γ H2AX- bzw. 53BP1-Foci pro Zelle nach Bestrahlung induziert, als in den WT-Mäusen. Nach langen Reparaturzeiten (24 h bzw. 72 h) ist in allen Zelltypen von AT-Mäusen ein deutlicher Defekt in der Reparatur von, durch γ H2AX- bzw. 53BP1-markierten, DSBs zu beobachten. Die Anzahl der verbleibenden γ H2AX- bzw. 53BP1-Foci in diesen Zelltypen ist vergleichbar mit der Anzahl in Stäbchen-PRs von sowohl AT-Mäusen als auch WT-Mäusen.

Die Anzahl der nach Bestrahlung induzierten γ H2AX- bzw. 53BP1-Foci pro Zelle in SCID-Mäusen, liegt bei allen Zelltypen zwischen der von WT- und AT-Mäusen, mit Ausnahme der Niere. In der Niere wird verglichen mit dem WT eine erhöhte Anzahl an 53BP1-Foci ausgebildet.

Der in den Stäbchen-PRs auftretende DNA-PK-abhängige Reparaturdefekt, der dort schon ab einer Reparaturzeit von 30 min zu beobachten ist, ist in den Zapfen-PRs 24 h nach Bestrahlung deutlich schwächer ausgeprägt. Die Anzahl an verbleibenden γ H2AX-Foci liegt hierbei unter der Anzahl, welche bei den Zapfen-PRs von AT-Mäusen zu diesem Zeitpunkt vorkommt. Auch in den Zellen der INL kann mit Ausnahme des 2,5 h Reparaturzeitpunktes im weiteren Verlauf der Reparatur ein weniger stark ausgeprägter DNA-PK-abhängiger Defekt beobachtet werden. Nach 24 h bzw. 72 h liegt die Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle auf dem Level von Zellen der INL von AT-Mäusen. In den Zellen der Niere ist bei den SCID-Mäusen ein DNA-PK-abhängiger Reparaturdefekt nach Bestrahlung zu erkennen, jedoch nähert dieser sich nach 72 h wieder dem AT-Level an.

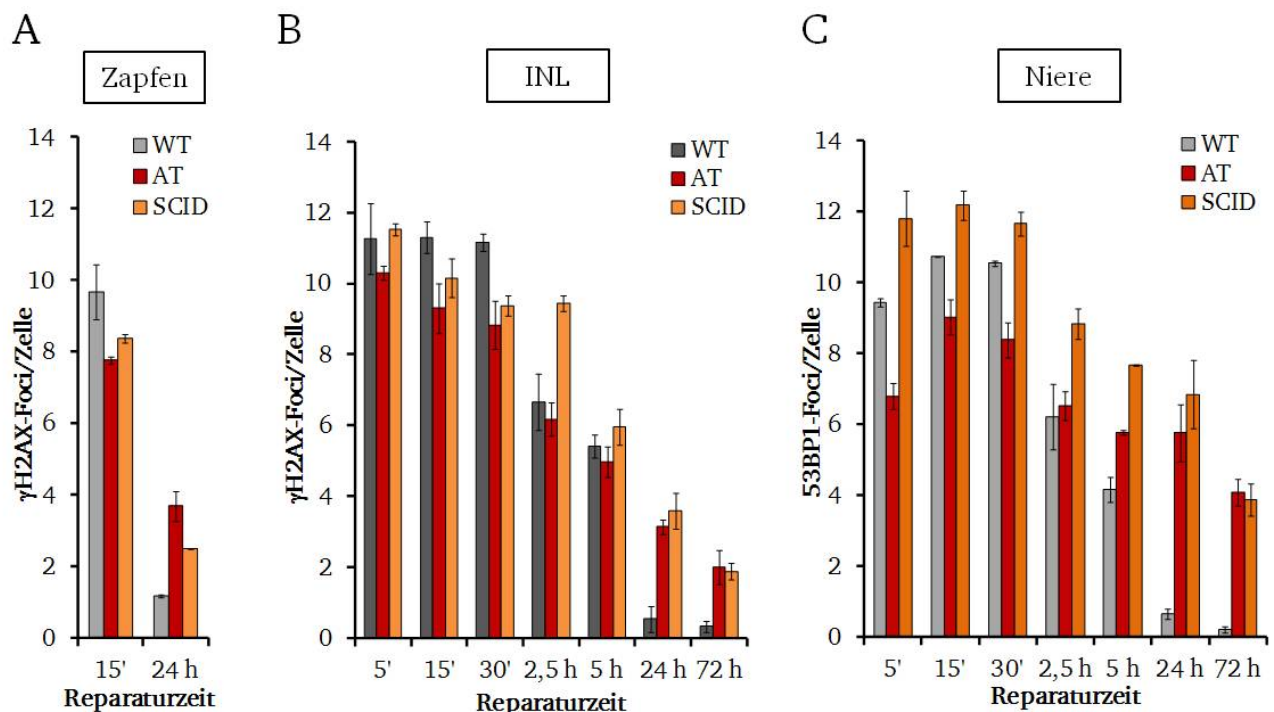


Abbildung 34: Untersuchung der ATM- und DNA-PK-abhängigen DSB-Reparatur in Zapfen-PRs, Zellen der INL und Zellen der Niere von WT-, AT- und SCID-Mäusen mittels γ H2AX-Foci Analyse. Quantitative Analyse von γ H2AX- bzw. 53BP1-Foci pro Zelle in Zapfen-PRs (A), Zellen der INL (B) und Zellen der Niere (C) von WT-, AT- und SCID-Mäusen 5 min; 15 min; 30 min; 2,5 h; 5 h; 24 h und 72 h nach Bestrahlung mit 1 Gy. In allen untersuchten Gewebe-Zelltypen von WT-Mäusen werden vergleichbar viele γ H2AX- bzw. 53BP1-Foci pro Zelle nach Bestrahlung induziert, welche nach Reparaturzeiten von 24 h bzw. 72 h fast vollständig verschwunden sind. In allen untersuchten Zelltypen von AT-Mäusen werden etwas weniger γ H2AX- bzw. 53BP1-

Foci induziert als in WT-Mäusen. Nach langen Reparaturzeiten (24 h bzw. 72 h) sind in allen Zelltypen von AT-Mäusen vermehrt verbleibende γ H2AX- bzw. 53BP1-Foci zu beobachten. Die Anzahl der nach Bestrahlung induzierten γ H2AX- bzw. 53BP1-Foci pro Zelle in SCID-Mäusen, liegt bei allen Zelltypen zwischen der von WT- und AT-Mäusen, mit Ausnahme der Niere. In der Niere wird verglichen mit dem WT eine erhöhte Anzahl an 53BP1-Foci ausgebildet. Nach Reparaturzeiten von 24 bzw. 72 h verbleiben in den Zapfen-PRs von SCID-Mäusen etwas weniger γ H2AX-Foci als in den von AT-Mäusen. Die Anzahl an verbleibenden γ H2AX- bzw. 53BP1-Foci in Zellen der INL und Zellen der Niere ist vergleichbar mit der von AT-Mäusen. Die Fehlerbalken stellen die Streuung zwischen den ermittelten Einzelwerten aus 2 unabhängigen Färbungen dar (n=1).

In diesem Kapitel konnte also gezeigt werden, dass die Stäbchen-PRs von WT-Mäusen, bei denen das konstitutive Heterochromatin in einem zentral lokalisierten Chromocenter angeordnet ist und bei denen nach Bestrahlung keine pATM-Foci zu beobachten waren, einen vergleichbaren Reparaturdefekt aufweisen, wie er in Zapfen-PRs und anderen Gewebe-Zelltypen von AT-Mäusen zu beobachten ist.

4.7.3. DSB-Reparatur in Stäbchen-Photorezeptoren der adulten Mausretina nach Anwendung von ATM- und DNA-PK Inhibitoren in *ex vivo*-Kulturen

Im Kapitel 4.7.1. wurde gezeigt, dass sich in Stäbchen-PRs von WT-, AT- und SCID-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung unterschiedlich viele γ H2AX-Foci ausbilden. Um die Beteiligung von ATM und DNA-PK bei der frühen Ausbildung von γ H2AX-Foci in Stäbchen-PRs genauer zu untersuchen, wurden Retina-Explantate von WT-Mäusen *ex vivo* kultiviert. Diese Form der Kultivierung erlaubt nicht nur das Fixieren der Retinae zu sehr frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung, sondern auch den Einsatz von DNA-PK- und ATM-Inhibitoren, welcher die Verwendung von SCID- und AT-Mäusen ersetzen kann. Dafür sollten jedoch zunächst die optimalen Konzentrationen dieser Inhibitoren in Versuchen mit murinen Fibroblasten (NIH-3T3) ermittelt werden, da diese bei Verwendung von zu hohen Konzentrationen auch unspezifisch andere Kinasen hemmen können (Datenblatt des Inhibitor-Herstellers).

Dafür wurden konfluente, murine Fibroblasten (NIH-3T3) 90 min vor Bestrahlung mit DMSO, ATM-Inhibitor (ATMi) (20 μ M, 10 μ M, 5 μ M oder 3 μ M) oder DNA-PK-Inhibitor (DNA-PKi) (10 μ M, 5 μ M oder 1 μ M) behandelt. Die auf Glas-Deckgläsern gewachsenen Zellen wurden effektiv mit 500 mGy bestrahlt und nach 15 min, 2 h, 8 h und 24 h fixiert. Anschließend wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit einem gegen γ H2AX-gerichteten Antikörper durchgeführt und die durchschnittliche Anzahl an strahleninduzierten γ H2AX-Foci pro Zellkern für die jeweiligen Proben ermittelt. Bei der Auswertung wurden nur G1-Phase Zellen analysiert.

In den mit DMSO behandelten Zellen werden 15 min nach Bestrahlung ~ 26 γ H2AX-Foci pro Zelle ausgebildet (Abbildung 35). Nach einer Reparaturzeit von 2 h sind noch ~ 14 , durch γ H2AX markierte, DSBs vorhanden. Die meisten induzierten DSBs sind 8 h nach Bestrahlung bereits repariert (~ 2 γ H2AX-Foci pro Zelle). Nach einer Reparaturzeit von 24 h weisen die Zellen durchschnittlich nur noch ~ 1 γ H2AX-Focus pro Zelle auf.

Nach ATMi-Behandlung sind 15 min nach Bestrahlung bei keiner der angewandten Konzentrationen (20 μ M, 10 μ M, 5 μ M oder 3 μ M) γ H2AX-Foci detektierbar. Nach einer Reparaturzeit von 2 h ist die Anzahl der γ H2AX-Foci bei allen Konzentrationen vergleichbar mit der von DMSO-behandelten Zellen zu diesem Zeitpunkt (~ 14 γ H2AX-Foci pro Zelle). Eine Ausnahme stellen die mit 20 μ M ATMi-behandelten Zellen dar, welche eine leicht erhöhte Anzahl an γ H2AX-Foci aufweisen (~ 17 γ H2AX-Foci pro Zelle). Verglichen mit DMSO behandelten Zellen ist 8 h nach Bestrahlung ein deutlicher Reparaturdefekt der strahleninduzierten DSBs nach ATMi Behandlung zu beobachten. Bei einer Konzentration von 20 μ M sind noch ~ 13 γ H2AX-Foci und bei 5, 10 und 3 μ M ~ 8 γ H2AX-Foci pro Zelle vorhanden. Dieses erhöhte Focilevel nach ATMi-Behandlung ist auch nach 24 h bei allen angewandten Konzentrationen noch sichtbar, wobei die Anzahl konzentrationsabhängig zwischen 5 und 8 γ H2AX-Foci pro Zelle liegt.

Die Anzahl an induzierten γ H2AX-Foci nach DNA-PKi Behandlung ist verglichen mit DMSO behandelten Zellen etwas niedriger. Bei einer Konzentration von 10 μ M DNA-PKi traten 15 min nach Bestrahlung geringfügig weniger γ H2AX-Foci auf (~ 19 γ H2AX-Foci pro Zelle) als nach Behandlung mit 5 μ M oder 1 μ M DNA-PKi (~ 23 γ H2AX-Foci pro Zelle). Bereits nach einer Reparaturzeit von 2 h

ist in den mit DNA-PKi behandelten Zellen ein deutlicher Reparaturdefekt von DSBs zu beobachten, wobei die Anzahl an γ H2AX-Foci bei 10 und 5 μ M \sim 22 γ H2AX-Foci pro Zelle beträgt. Nach Behandlung der Zellen mit 1 μ M DNA-PKi wurden schon mehr der γ H2AX-markierten DSBs repariert (\sim 17 γ H2AX-Foci pro Zelle). Auch 8 h nach Bestrahlung wurden nach DNA-PKi-Behandlung (10 und 5 μ M) noch \sim 18 γ H2AX-Foci pro Zelle detektiert, während bei einer Konzentration von 1 μ M nur noch \sim 4 γ H2AX-Foci pro Zelle auftraten. Nach einer Reparaturzeit von 24 h verblieben in den mit DNA-PKi behandelten Zellen bei 10 μ M noch \sim 12 der γ H2AX-markierten DSBs unrepariert. Nach 5 μ M DNA-PKi sind es noch \sim 6 verbleibende DSBs und nach 1 μ M noch \sim 3 DSBs.

Somit konnte gezeigt werden, dass die frühe Ausbildung von γ H2AX-Foci in murinen Fibroblasten (NIH-3T3) durch die Inhibition von ATM beeinträchtigt ist, während sich ein DSB-Reparaturdefekt erst ab einem späteren Reparaturzeitpunkt (\sim 8 h) nachweisen lässt. Die Inhibition von DNA-PK beeinträchtigt die Ausbildung der γ H2AX-Foci in murinen Fibroblasten nur gering, führt dagegen aber zu einem früher auftretenden Reparaturdefekt (bereits ab \sim 2 h). Die nach ATM- und DNA-PK-Defizienz auftretenden DSB-Reparaturdefekte wurden für Fibroblasten und für unterschiedliche Mausgewebe bereits in der Literatur beschrieben^{78,110,160}.

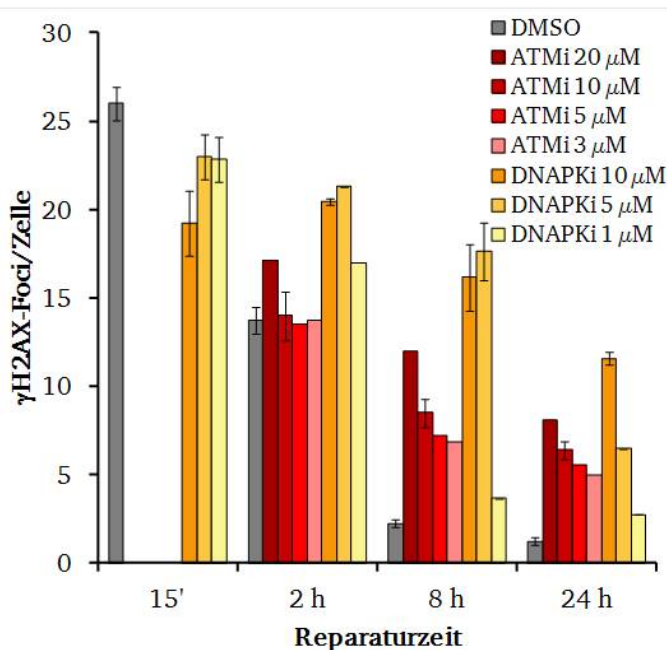


Abbildung 35: Untersuchung der DSB-Reparatur in murinen Fibroblasten (NIH-3T3) mittels γ H2AX-Foci Analyse nach Behandlung mit DMSO, ATMi und DNA-PKi. Murine Fibroblasten wurden vor der Bestrahlung entweder mit DMSO, mit ATMi-Konzentrationen von 20, 10, 5 oder 3 μ M, oder mit DNA-PKi-Konzentrationen von 10, 5, oder 1 μ M behandelt. Nach Bestrahlung der Fibroblasten mit effektiv 500 mGy und Reparaturzeiten von 15 min, 2 h, 8 h und 24 h wurde die Anzahl von γ H2AX-Foci pro Zelle ermittelt. In den mit DMSO behandelten Fibroblasten wurden 24 h nach Bestrahlung fast alle strahleninduzierten, durch γ H2AX-markierten, DSBs repariert. Die Behandlung der Fibroblasten mit ATMi beeinträchtigt die frühe Ausbildung von γ H2AX-Foci, während nach späteren Reparaturzeiten (ab \sim 8 h) ein ATM-abhängiger Reparaturdefekt zu beobachten ist. Nach DNA-PKi-Behandlung trat schon nach frühen Reparaturzeiten (ab 2 h) ein Defekt in der DSB-Reparatur auf. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Experimenten dar (n=1-5).

Anhand dieser Inhibitorstudie in Fibroblasten wurde mittels γ H2AX-Analyse festgestellt, dass eine ATMi-Konzentration von 10 μ M nach Bestrahlung geeignet ist um die Aktivität von ATM ausreichend zu inhibieren und den bereits beschriebenen Reparaturdefekt von DSBs zu späteren Zeiten nach Bestrahlung hervorzurufen¹¹⁰. Eine Konzentration von 5 μ M DNA-PKi führt zu dem für DNA-PKi beschriebenen Reparaturdefekt von DSBs zu frühen Zeiten nach Bestrahlung⁷⁸.

Nachdem die optimalen Konzentrationen der Inhibitoren für die *in vitro*-Kultur muriner Fibroblasten bestimmt wurden, wurden im Anschluss daran Versuche mit Retina-Explantaten durchgeführt. Die Herstellung und Kultivierung der Retina-Explantate wurde bereits in Kapitel 3.2.6. beschrieben. Dem Medium der *ex vivo*-Kulturen wurde 90 min vor Bestrahlung mit 1 Gy entweder DMSO, 10 μ M ATM Inhibitor (ATMi), oder 5 μ M DNA-PK Inhibitor (DNA-PKi) zugesetzt. Nach Reparaturzeiten von 30 s; 1 min; 2 min; 5 min; 10 min; 15 min; 30 min; 1 h; 2 h; 4 h und 8 h wurden die Retina-Explantate fixiert und Paraffinschnitte von diesen angefertigt. Mit Hilfe eines gegen γ H2AX-gerichteten Antikörpers wurden anschließend Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die nach Bestrahlung auftretenden γ H2AX-Foci wurden mit Hilfe von Aufnahmen am Konfokalmikroskop ausgewertet und die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle ermittelt.

Ebenfalls wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen überprüft, wie sich die Morphologie der Retina nach *ex vivo*-Kultivierung und DMSO-Behandlung verhält bzw. ob die Ausbildung von γ H2AX-Foci 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy gewährleistet ist. Wie in Abbildung 36 gezeigt sind weder bei der Morphologie der Retina noch bei der Ausbildung der γ H2AX-Foci innerhalb der ONL Unterschiede zur *in vivo*-Situation erkennbar. Die Ausbildung von γ H2AX-Foci innerhalb der INL scheint hingegen bei den *ex vivo*-Kulturen gestört zu sein, da lediglich Zellen der mittleren INL γ H2AX-Foci aufweisen. Auch in den Zellen der GCL ist kaum eine Bildung von γ H2AX-Foci zu erkennen. Aus diesem Grund wurden Retina-Explantate nur bis 8 h nach Bestrahlung kultiviert, um weitere *ex vivo*-bedingte Defekte in der Ausbildung von γ H2AX-Foci einzuschränken.

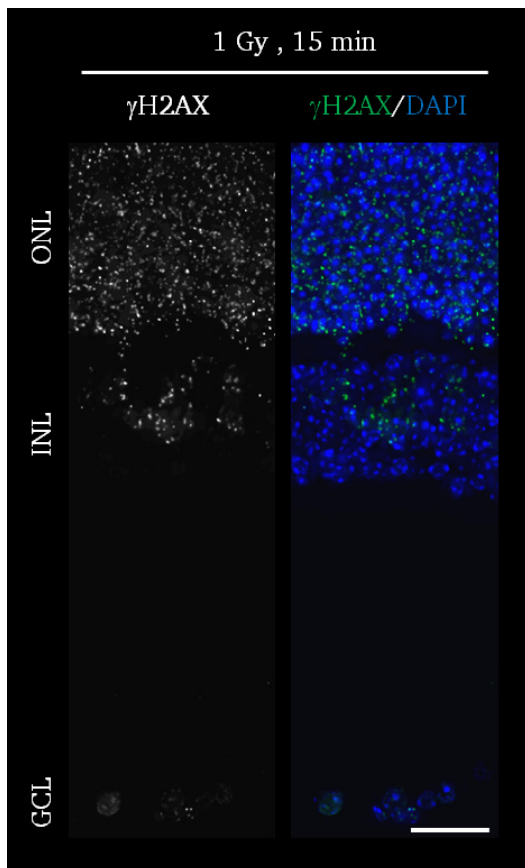


Abbildung 36: Einfluss der *ex vivo*-Kultivierung mit DMSO auf die Ausbildung von γ H2AX-Foci in verschiedenen Schichten (ONL, INL und GCL) der adulten Mausretina. Immunfluoreszenzfärbung von DSBs mit Hilfe eines gegen γ H2AX-gerichteten Antikörpers (grün) in Zellkernen der adulten Mausretina 15 min nach *ex vivo*-Bestrahlung mit 1 Gy. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). In der ONL bilden sich in allen Zellkernen nach Bestrahlung zahlreiche γ H2AX-Foci aus, während nur einige Zellen der mittleren INL Foci aufweisen. Auch in der GCL sind nur wenige γ H2AX-Foci detektierbar. Maßstab: 20 μ m.

Um sicherzustellen, dass in den Stäbchen-PRs ausschließlich ATM und DNA-PK an der Phosphorylierung von H2AX zu γ H2AX beteiligt sind wurde in einem weiteren Experiment eine Inhibition beider Kinasen vorgenommen. Die Fluoreszenzaufnahmen der ONL-Ausschnitte zeigen, dass sich γ H2AX-Foci nach der Behandlung mit jeweils einem der beiden Inhibitoren (ATM- oder DNA-PK-Inhibitor) ausbilden, ähnlich wie bei der DMSO behandelten *ex vivo*-Kultur (Abbildung 37). Eine gleichzeitige Anwendung beider Inhibitoren verhindert jedoch die Entstehung von γ H2AX-Foci. Daraus kann geschlußfolgert werden, dass ausschließlich ATM und DNA-PK für die Phosphorylierung von H2AX verantwortlich sind.

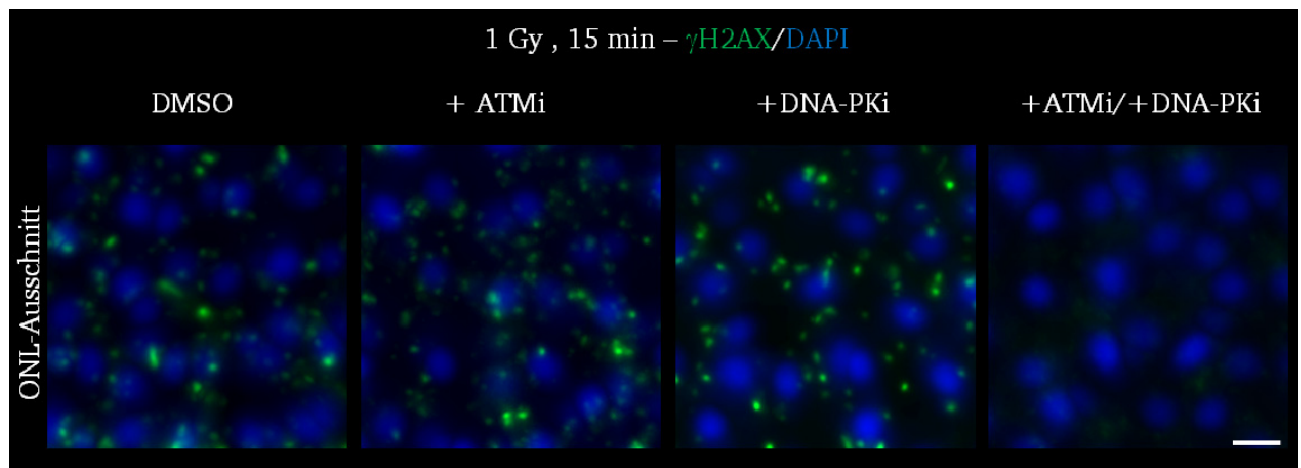


Abbildung 37: Einfluss der DMSO-, ATMi- und DNA-PKi-Behandlung auf die Ausbildung von γ H2AX-Foci in Zellen der ONL. Immunfluoreszenzfärbung von DSBs mit Hilfe eines gegen γ H2AX-gerichteten Antikörpers (grün) in Zellkernen der adulten Mausretina 15 min nach *ex vivo*-Bestrahlung von Retina-Explantate mit 1 Gy. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Nach Behandlung der Retina-Explantate mit DMSO, ATMi (10 μ M) oder DNA-PKi (5 μ M) sind nach Bestrahlung in allen Zellen der ONL γ H2AX-Foci nachzuweisen. Bei der gleichzeitigen Anwendung von ATMi und DNA-PKi werden nach Bestrahlung jedoch keine γ H2AX-Foci ausgebildet. Maßstab: 5 μ m.

Die quantitative Auswertung von γ H2AX-Foci pro Zelle nach *ex vivo*-Bestrahlung zeigt, dass bereits 30 s nach der Bestrahlung mit 1 Gy, bei den mit DMSO behandelten Explantaten, in den Stäbchen-PRs durchschnittlich ~ 4 γ H2AX-Foci pro Zelle auftreten (Abbildung 38). Die Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle steigt kontinuierlich bis 15 min nach Bestrahlung auf ~ 9 an. Bei Behandlung mit einem ATM Inhibitor (ATMi, 10 μ M) sind zu sehr frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung noch keine γ H2AX-Foci detektierbar. Erst 5 min nach Bestrahlung ist eine durchschnittliche Anzahl von $\sim 3,5$ γ H2AX-Foci pro Zelle zu erkennen. Diese erhöht sich im weiteren Verlauf auf einen maximalen Wert von $\sim 6,5$ γ H2AX-Foci pro Zelle (10 min; 15 min). Bei Behandlung mit einem DNA-PK Inhibitor (DNA-PKi, 5 μ M) werden 30 s nach Bestrahlung durchschnittlich $\sim 3,5$ γ H2AX-Foci pro Zelle induziert. Dieser Wert liegt nur geringfügig unter dem von mit DMSO behandelten Explantaten (~ 4). Im weiteren Verlauf kommt es verglichen mit den DMSO behandelten Proben nur zu einem minimalen Anstieg an γ H2AX-Foci pro Zelle bis 5 min nach Bestrahlung (~ 5 γ H2AX-Foci pro Zelle). Zwischen 5 und 10 min nach Bestrahlung steigt die Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle etwas stärker an auf $\sim 6,5$; erreicht jedoch als maximalen Wert nur das Level von mit ATMi behandelten Proben zu diesem Zeitpunkt.

Vergleicht man die Reparaturkinetik der Stäbchen-PRs von DMSO behandelten, *ex vivo* bestrahlten Explantaten mit der von *in vivo* bestrahlten Explantaten (Abbildung 33) fällt auf, dass zu den frühen Zeitpunkten (5 min; 15 min; 30 min) *ex vivo* durchschnittlich $\sim 1-2$ γ H2AX-Foci pro Zelle weniger induziert werden als *in vivo*. Der weitere Reparaturverlauf unterscheidet sich im Bezug auf die durchschnittliche Anzahl der γ H2AX-Foci pro Zelle jedoch kaum. Auch *ex vivo* verbleiben nach einer längeren Reparaturzeit von 8 h noch $\sim 5,5$ γ H2AX-Foci pro Zelle.

Auch bei den mit ATMi behandelten, *ex vivo* bestrahlten Stäbchen-PRs sind verglichen mit *in vivo* leichte Schwankungen der initialen γ H2AX-Foci zu beobachten. Nach *ex vivo*-Bestrahlung werden durchschnittlich ~ 2 γ H2AX-Foci pro Zelle weniger induziert als nach Bestrahlung *in vivo*. Im weiteren Reparaturverlauf unterscheidet sich die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle *ex vivo* jedoch kaum zu der *in vivo*. Somit verbleiben in den Stäbchen-PRs *ex vivo* etwa gleich viele γ H2AX-Foci pro Zelle in den mit ATMi behandelten, wie auch in den mit DMSO behandelten Explantaten.

Die Reparaturkinetiken nach DMSO- und ATMi-Behandlung sind in ihrem Verlauf, trotz ihrer Schwankungen in der Anzahl an γ H2AX-Foci, also gut vergleichbar mit der von WT- und AT-Mäusen nach *in vivo* Bestrahlung.

Anders verhält es sich mit der Reparaturkinetik von den mit DNA-PKi behandelten Explantaten nach *ex vivo*-Bestrahlung im Vergleich zu *in vivo* bestrahlten SCID-Mäusen. Hier werden in den Stäbchen-PRs bei allen Zeitpunkten deutlich weniger γ H2AX-Foci pro Zelle ausgebildet. Der DNA-PK-abhängige Reparaturdefekt, der sich in SCID-Mäusen nach Bestrahlung *in vivo* deutlich zeigte, ist nicht zu

beobachten. Zu späten Reparaturzeitpunkten liegt die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci in den Stäbchen-PRs auf dem Level von mit DMSO- und ATMi behandelten Explantaten *ex vivo*.

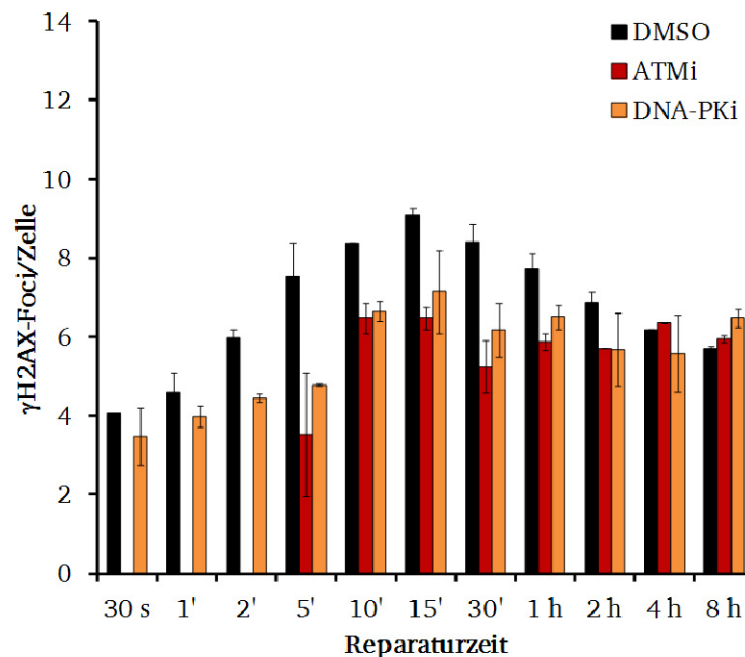


Abbildung 38: Untersuchung der ATM- und DNA-PK-abhängigen DSB-Reparatur in Stäbchen-PRs von *ex vivo*-kultivierten Retina-Explantaten nach DMSO-, ATMi- und DNA-PKi-Behandlung mittels γ H2AX-Foci Analyse. Quantitative Analyse von γ H2AX-Foci pro Zelle in Stäbchen-PRs von *ex vivo* kultivierten Retina-Explantaten nach DMSO-, ATMi- (10 μ M) und DNA-PKi (5 μ M)-Behandlung 30 s, 1 min, 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h nach Bestrahlung mit 1 Gy. Nach Behandlung der Retina-Explantate mit DMSO wurden in Stäbchen-PRs bereits 30 s nach Bestrahlung γ H2AX-Foci ausgebildet. Die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci nimmt bis 15 min nach Bestrahlung zu. Nach einer Reparaturzeit von 8 h verbleiben noch ~ 2/3 der nach 15 min vorhandenen γ H2AX-Foci. Nach ATMi-Behandlung treten γ H2AX-Foci erst 5 min nach Bestrahlung auf. Die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci steigt 10 bzw. 15 min nach Bestrahlung auf ein Maximum an, welches jedoch noch unter dem der mit DMSO behandelten Retina-Explantate liegt. Zwischen 15 min und 8 h nach Bestrahlung ist nach ATMi-Behandlung kaum eine Abnahme in der Anzahl von γ H2AX-Foci zu beobachten. Die Anzahl an verbleibenden γ H2AX-Foci nach ATMi-Behandlung ist jedoch 8 h nach Bestrahlung vergleichbar mit der nach DMSO-Behandlung. Im Vergleich zur DMSO-Behandlung werden nach DNA-PKi-Behandlung 30 s nach Bestrahlung etwa gleich viele γ H2AX-Foci induziert, welche jedoch bis 15 min nach Bestrahlung langsamer ansteigen und die maximale Anzahl an γ H2AX-Foci nach DMSO-Behandlung nicht erreichen. Zwischen 15 min und 8 h nach Bestrahlung ist auch nach DNA-PKi-Behandlung kaum eine Abnahme in der Anzahl von γ H2AX-Foci zu beobachten. Die Anzahl an verbleibenden γ H2AX-Foci nach DNA-PKi-Behandlung ist jedoch 8 h nach Bestrahlung vergleichbar mit der nach DMSO- und ATMi-Behandlung. Die Fehlerbalken stellen die Streuung zwischen den ermittelten Einzelwerten aus 2 unabhängigen Färbungen dar (n=2).

4.8. Expression und Phosphorylierung von KAP1 in der adulten und der postnatalen Mausretina

Wie in den Kapiteln 4.4. und 4.7.1. gezeigt werden konnte, besitzen die Stäbchen-Photorezeptoren (Stäbchen-PRs) von WT-Mäusen, welche eine besondere Chromatinstruktur aufweisen, eine eingeschränkte Fähigkeit zur Reparatur strahleninduzierter DSBs. Diese schlechte Reparaturfähigkeit ist vergleichbar mit dem Reparaturdefekt, wie er in allen Gewebezelltypen von AT-Mäusen zu finden ist. Ebenfalls konnte beobachtet werden, dass in den Stäbchen-PRs von WT-Mäusen initial keine strahleninduzierten pATM-Foci ausgebildet werden (Kapitel 4.1.). Die Bipolarzellen der INL, die ebenfalls keine pATM-Foci ausbilden, aber eine normale Chromatinstruktur aufweisen, zeigen keine eingeschränkte Reparatur (Kapitel 4.2., 4.4. und 4.7.2.). Es ist bekannt, dass pATM eine wichtige Rolle bei der Reparatur heterochromatischer DSBs spielt, indem es den Heterochromatin-bildenden Faktor KAP1 (*Krüppel-associated protein 1*) phosphoryliert und somit inaktiviert^{113,114}. Dies hat eine Auflockerung des Heterochromatins zur Folge, wodurch die Reparatur der darin gelegenen Brüche

ermöglicht wird. Um zu untersuchen, inwieweit das Fehlen von pATM-Foci in den Stäbchen-PRs eine Auswirkung auf die Phosphorylierung von KAP1 und somit auf die Reparatur heterochromatischer DSBs hat, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit einem gegen KAP1- sowie einem gegen pKAP1-gerichteten Antikörper, in der adulten und der postnatalen Retina von unbestrahlten bzw. von mit 1 Gy bestrahlten WT-Mäusen 15 min nach Bestrahlung vorgenommen.

In der unbestrahlten adulten Mausretina befindet sich KAP1 in allen Schichten (Abbildung 39). Die meisten Zellkerne der ONL weisen lediglich eine schwache, ringförmige Färbung in der Peripherie des Zellkerns auf, während einzelne Zellen der ONL ein stärkeres KAP1-Signal zeigen. Diese einzelnen Zellen konnten mit Hilfe einer Doppelfärbung gegen KAP1 und gegen das Zapfen-spezifische Protein Arrestin als Zapfen-PRs identifiziert werden (nicht gezeigt). In allen Zellen der INL und GCL ist ein deutliches KAP1-Signal zu erkennen.

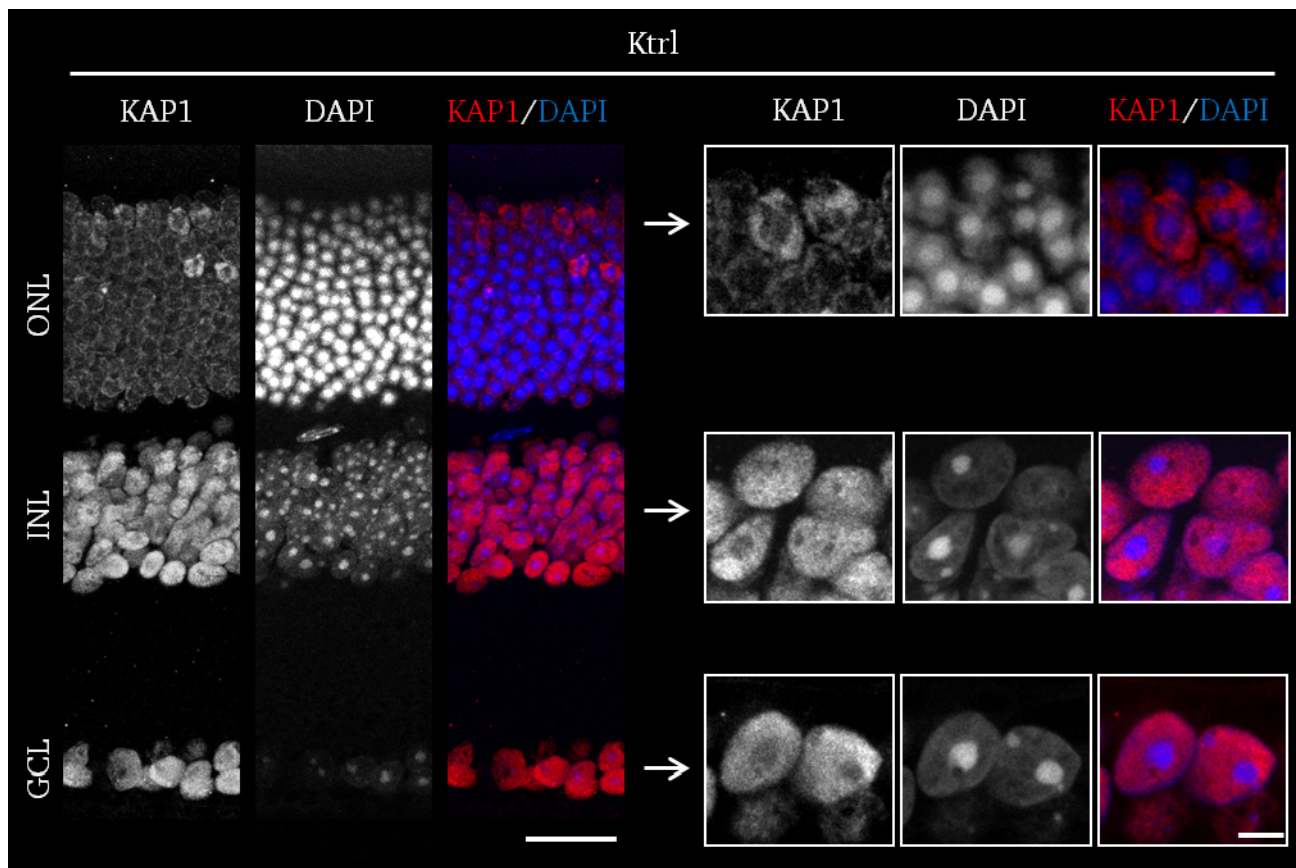


Abbildung 39: Vorkommen von KAP1 in unterschiedlichen Schichten (ONL, INL und GCL) der adulten Mausretina. Immunfluoreszenzfärbung mit einem gegen KAP1-gerichteten Antikörper (rot) in unterschiedlichen Schichten der unbestrahlten (Ktrl) adulten Mausretina. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). KAP1 ist in allen Retinaschichten vorhanden, wobei die meisten Zellkerne der ONL lediglich eine schwache ringförmige Färbung aufweisen, während in einzelnen Zellkernen der ONL ein deutlich stärkeres KAP1-Signal auftritt. In der INL und der GCL ist KAP1 in allen Zellkernen detektierbar. Das KAP1-Signal scheint in allen Zellkernen der adulten Mausretina in den heterochromatischen Bereichen schwächer ausgeprägt zu sein, als in den euchromatischen Bereichen. Maßstäbe: Retinaübersicht 20 µm; Vergrößerung ONL, INL, GCL 5 µm.

Das KAP1-Signal ist in allen Zellkernen in den euchromatischen Bereichen deutlich stärker ausgeprägt als in den heterochromatischen (intensiv DAPI-gefärbten) Bereichen. Die euchromatischen Bereiche, welche mit einem gegen H3K4me3-gerichteten Antikörper sichtbar gemacht wurden, sind die Bereiche, die auch ein stärkeres Kap1-Signal aufweisen (Abbildung 40).

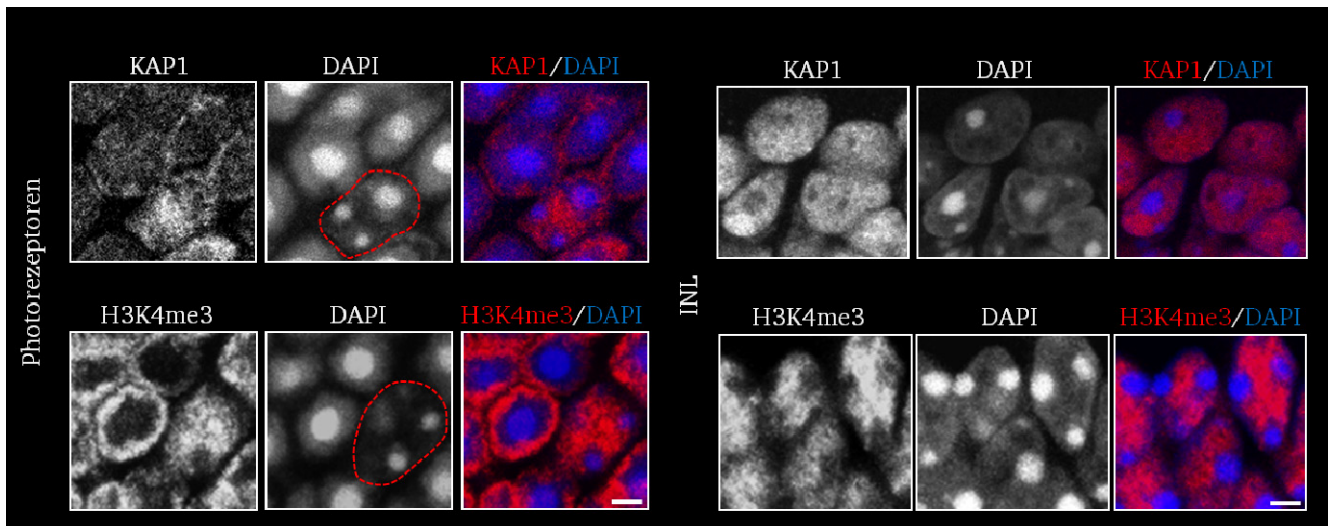


Abbildung 40: Vorkommen von KAP1 innerhalb des Chromatins der adulten Mausretina. Immunfluoreszenzfärbung mit einem gegen KAP1-gerichteten Antikörper (rot) in Photorezeptoren und Zellen der INL einer unbestrahlten adulten Mausretina. Die euchromatischen DNA-Bereiche wurden mit einem gegen H3K4me3-gerichteten Antikörper sichtbar gemacht (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Das KAP1-Signal ist in allen Zellen in den euchromatischen Bereichen (H3K4me3-positiv) stärker ausgeprägt als in den heterochromatischen Bereichen (DAPI-intensiv). Dadurch kommt es in den Stäbchen-PRs zu einer ringförmigen KAP1-Färbung in der Peripherie des Zellkerns. Die Zapfen-PRs (rot umrandet) zeigen dagegen ein über die Zellkerne verteiltes KAP1-Signal innerhalb der euchromatischen Bereiche. In den Zellen der INL ist das KAP1-Signal ebenfalls in den euchromatischen H3K4me3-positiven Bereichen am stärksten. Maßstab: 2 μ m.

Nach Bestrahlung der WT-Mäuse mit 1 Gy kommt es 15 min nach Bestrahlung in der Retina zur Phosphorylierung von KAP1 (pKAP1) (Abbildung 41). Während in den Stäbchen-PRs kaum ein pKAP1-Signal zu beobachten ist, kann in den Zapfen-PRs ein deutliches pKAP1-Signal detektiert werden. Die Zellen der INL zeigen eine ungleichmäßige pKAP1 Verteilung. Die Zellen der mittleren INL sind stärker angefärbt, während das pKAP1-Signal in den Zellen der apikalen und basalen INL abgeschwächt ist. Auch die Zellkerne der GCL weisen ein unterschiedlich stark ausgeprägtes pKAP1-Signal auf. In den Zellkernen von unbestrahlten Mäusen (Ktrl) ist keine pKAP1-Färbung zu erkennen.

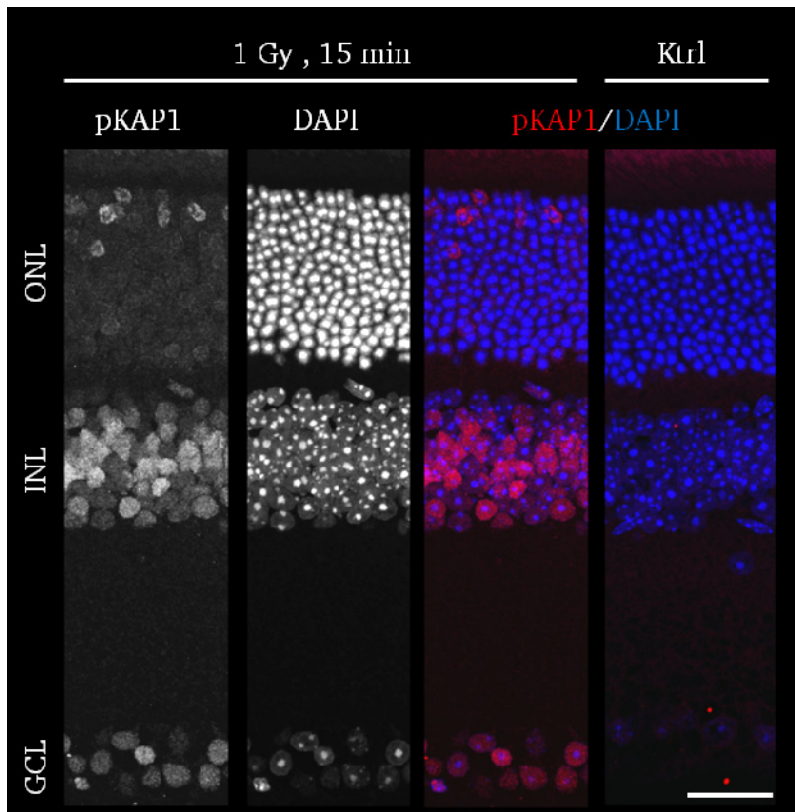


Abbildung 41: Vorkommen von pKAP1 in unterschiedlichen Schichten (ONL, INL und GCL) der adulten Mausretina. Immunfluoreszenzfärbung mit einem gegen pKAP1-gerichteten Antikörper (rot) in unterschiedlichen Schichten der adulten Mausretina 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). pKAP1 ist in allen Retinaschichten zu beobachten, wobei in den meisten Zellkernen der ONL kaum ein pKAP1-Signal nachzuweisen ist, während in einzelnen Zellkernen der ONL ein deutliches pKAP1-Signal auftritt. Die Zellen der INL zeigen eine ungleichmäßige pKAP1-Verteilung. Die Zellen der mittleren INL sind stärker angefärbt, während das pKAP1-Signal in den Zellen der apikalen und basalen INL abgeschwächt ist. Auch die Zellkerne der GCL weisen ein unterschiedlich stark ausgeprägtes pKAP1-Signal auf. In den Zellkernen von unbestrahlten Mäusen (Ktrl) ist keine pKAP1-Färbung zu erkennen. Maßstab: 20 µm.

In der unbestrahlten postnatalen Mausretina (P4) ist in allen Zellkernen ein mehr oder weniger stark ausgeprägtes KAP1-Signal zu beobachten (Abbildung 42). Die Zellkerne der apikalen NBL sind dabei weniger intensiv gefärbt als die Zellkerne der basalen NBL und der GCL. Auch im P4-Stadium ist das KAP1-Signal in den heterochromatischen Bereichen aller Zellkerne deutlich schwächer als in den euchromatischen Bereichen. Eine Ausnahme bilden hierbei wenige Zellen die sich in der mittleren NBL befinden. Diese zeigen eine verstärkte KAP1-Färbung im Heterochromatin. Diese Zellen konnten mit Hilfe einer Doppelfärbung mit Antikörpern gegen KAP1 und gegen den für Horizontalzellen spezifischen Transkriptionsfaktor Lim1 + 2 als Horizontalzellen identifiziert werden (nicht gezeigt).

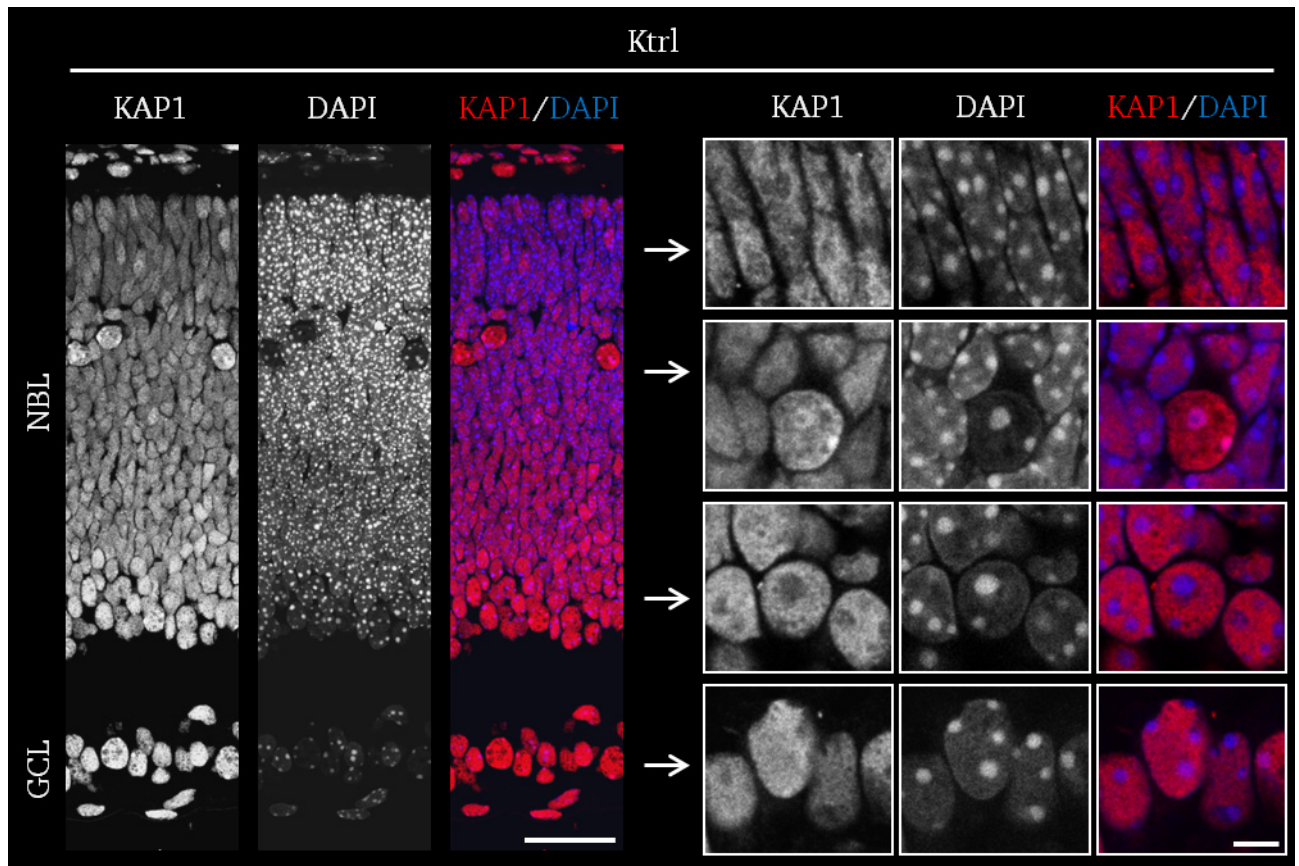


Abbildung 42: Vorkommen von KAP1 in unterschiedlichen Schichten (NBL und GCL) der postnatalen Mausretina (P4). Immunfluoreszenzfärbung mit einem gegen KAP1-gerichteten Antikörper (rot) in unterschiedlichen Schichten der unbestrahlten (Ktrl) postnatalen Mausretina. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Das KAP1-Signal ist in allen Retinaschichten mehr oder weniger stark ausgeprägt. Die Zellkerne der apikalen NBL sind weniger intensiv gefärbt als die der basalen NBL und der GCL. Das KAP1-Signal scheint in fast allen Zellkernen der postnatalen Mausretina in den heterochromatischen Bereichen schwächer ausgeprägt zu sein als in den euchromatischen Bereichen. Maßstäbe: Retinaübersicht 20 µm; Vergrößerung NBL, GCL 5 µm.

Wurden die postnatalen Mäuse mit 1 Gy bestrahlt, ist 15 min nach Bestrahlung ein pKAP1-Signal in allen Zellkernen zu sehen (Abbildung 43). Hierbei sind ähnlich wie bei der KAP1-Färbung intensiv und weniger intensiv gefärbte Zellkerne zu beobachten. In den Zellkernen von unbestrahlten postnatalen Mäusen (Ktrl) ist keine pKAP1 Färbung zu erkennen.

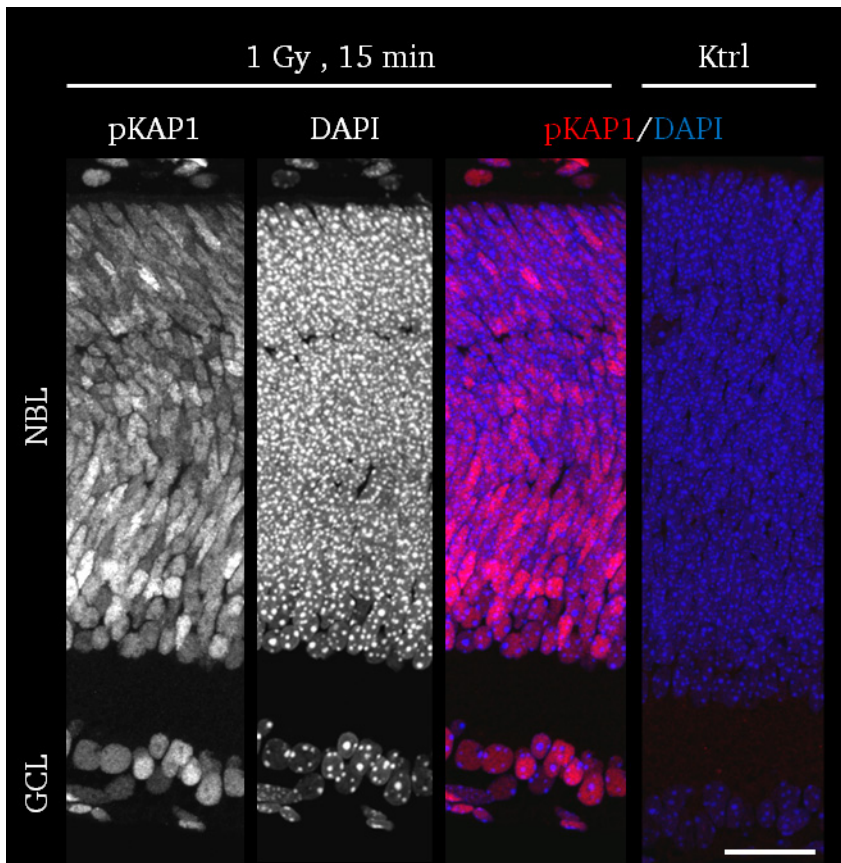


Abbildung 43: Vorkommen von pKAP1 in unterschiedlichen Schichten (NBL und GCL) der postnatalen Mausretina. Immunfluoreszenzfärbung von pKAP1 mit einem gegen pKAP1-gerichteten Antikörper (rot) in unterschiedlichen Schichten der postnatalen Mausretina 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). pKAP1 ist in allen Retinaschichten zu beobachten, wobei die Zellkerne ein mehr oder weniger stark ausgeprägtes pKAP1-Signal aufweisen. In den Zellkernen von unbestrahlten Mäusen (Ktrl) ist keine pKAP1-Färbung zu erkennen. Maßstab: 20 µm.

Um die Verteilung von KAP1 innerhalb des Chromatins auch in nicht neuronalen Zellen zu untersuchen wurde die KAP1-Färbung in weiteren Zelltypen des Auges betrachtet. In den an die Retina angrenzenden Zellen des Ciliarepithels, der Cornea oder der Linse ist das KAP1-Signal im adulten Stadium ebenfalls in den euchromatischen Bereichen am intensivsten. Im P4-Stadium ist KAP1 jedoch überwiegend in den heterochromatischen Bereichen lokalisiert, welche eine intensive DAPI-Färbung zeigen (Abbildung 44).

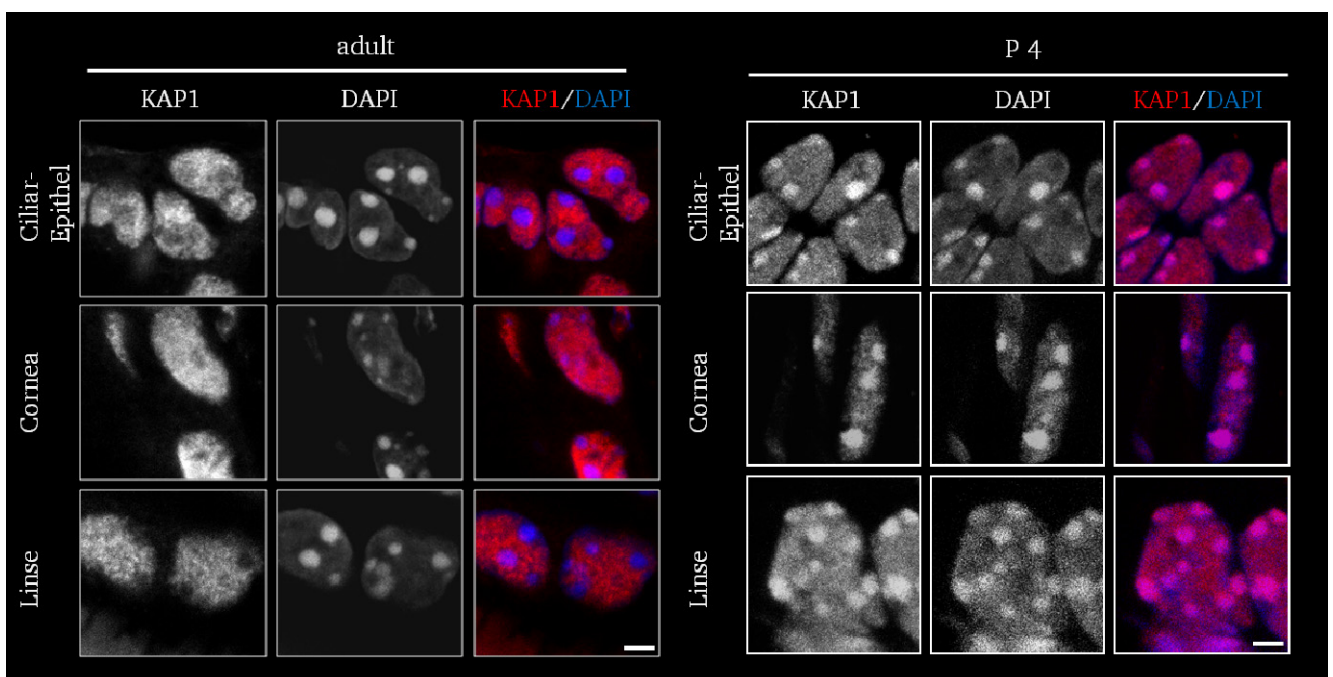


Abbildung 44: Vorkommen von KAP1 in Zellen des Ciliarepithels, der Cornea und der Linse adulter und postnataler Mäuse. Immunfluoreszenzfärbung von KAP1 mit einem gegen KAP1-gerichteten Antikörper (rot) in Zellen des Ciliarepithels, der

Cornea und der Linse von unbestrahlten Mäusen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). In diesen an die Retina angrenzenden Zellen ist KAP1 im adulten Stadium in den euchromatischen Bereichen am intensivsten gefärbt, während KAP1 im P4-Stadium überwiegend im Heterochromatin lokalisiert ist. Maßstab: 5 µm.

4.9. Lokalisation von DSBs innerhalb des Chromatins von Stäbchen-Photorezeptoren der adulten Mausretina nach Röntgenbestrahlung

ATM spielt bei der Reparatur heterochromatischer DSBs eine bedeutende Rolle. Die aktivierte Form von ATM (pATM) phosphoryliert den Heterochromatin-bildenden Faktor KAP1 (*Krüppel-associated protein 1*), was zu einer Öffnung des Heterochromatins (HC) und somit zu einer verbesserten Reparatur von DSBs führt^{109,110}. Nach Inhibition von ATM konnten nach Bestrahlung muriner Fibroblasten verbleibende γ H2AX-Foci an der Peripherie des HCs beobachtet werden.

In Kapitel 4.4. konnte gezeigt werden, dass die Stäbchen-Photorezeptoren (Stäbchen-PRs) von WT-Mäusen, bei denen das HC in einem einzigen zentral gelegenen Chromocenter organisiert ist, eine eingeschränkte Fähigkeit zur Reparatur strahleninduzierter DSBs aufweisen. Diese verschlechterte Reparaturkapazität ist vergleichbar mit dem Reparaturdefekt der in allen ATM-defizienten Zellen zu beobachten ist. In Kapitel 4.7.1. konnte gezeigt werden, dass auch die Anzahl verbleibender DSBs in den Stäbchen-PRs von AT-Mäusen vergleichbar mit der von WT-Mäusen ist. Ebenfalls konnte in den Stäbchen-PRs von WT-Mäusen keine strahleninduzierte Ausbildung von pATM-Foci beobachtet werden, obwohl die verminderte Ausbildung von γ H2AX-Foci zu frühen Zeitpunkten in den AT-Mäusen, sowie die Phosphorylierung von γ H2AX in SCID-Mäusen auf die Anwesenheit und Funktionalität von pATM hinweisen.

Um herauszufinden wo die strahleninduzierten γ H2AX-Foci in den Stäbchen-PR im Verlauf der Reparatur innerhalb des Chromatins lokalisiert sind, wurden Lokalisationsstudien von γ H2AX-Foci in verschiedenen Chromatinbereichen durchgeführt. Des Weiteren wurde der Einfluss von ATM und DNA-PK auf die Phosphorylierung von H2AX innerhalb des Chromatins während der Reparatur untersucht. Dazu wurden adulte WT-, AT- und SCID-Mäuse mit 1 Gy bestrahlt und 5 min; 15 min; 30 min, 2,5 h; 5 h; 24 h und 72 h nach Bestrahlung deren Augen entnommen und fixiert. Anschließend wurden Paraffinschnitte der Augen angefertigt und mit Hilfe eines gegen γ H2AX-gerichteten Antikörpers sowie eines gegen H3K4me3-gerichteten Antikörpers Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die H3K4me3-Färbung zeigt die euchromatischen, die intensive DAPI-Färbung die heterochromatischen Bereich. Dadurch konnte die Lokalisation strahleninduzierter γ H2AX-Foci bestimmt werden.

Nach Bestrahlung mit 1 Gy sind in den Stäbchen-PRs von WT-Mäusen initial durchschnittlich ~ 10 γ H2AX-Foci pro Zelle vorhanden (Abbildung 45, A). Davon sind etwa 60 % der γ H2AX-Foci im Euchromatin (EC), ~ 30 % im fakultativen Heterochromatin (HC_f) und 10 % im konstitutiven Heterochromatin (HC_k) lokalisiert. Nach Bestrahlung nimmt die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle im zeitlichen Verlauf anfangs schneller ab (~ 7 γ H2AX-Foci nach 2,5 h). Zu späteren Reparaturzeiten ist jedoch nur eine langsame Abnahme an γ H2AX-Foci pro Zelle zu beobachten (~ 4 γ H2AX-Foci nach 72 h). Die prozentuale Verteilung von γ H2AX-Foci innerhalb des Chromatins ändert sich im Verlauf der Reparatur nur unwesentlich. Während der prozentuale Anteil an euchromatischen γ H2AX-Foci im Vergleich zum initialen Zeitpunkt 5 min nach Bestrahlung tendenziell leicht abnimmt, steigt der von heterochromatischen γ H2AX-Foci leicht an. Nach einer Reparaturzeit von 72 h ist das prozentuale Verhältnis wieder vergleichbar mit dem initialen Zeitpunkt.

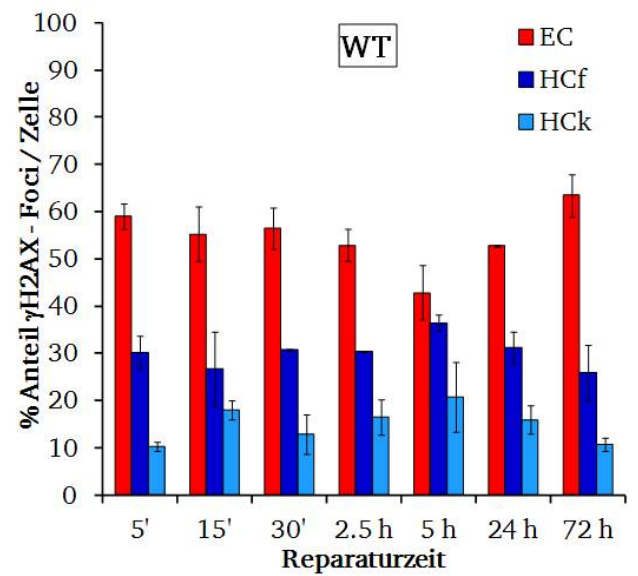
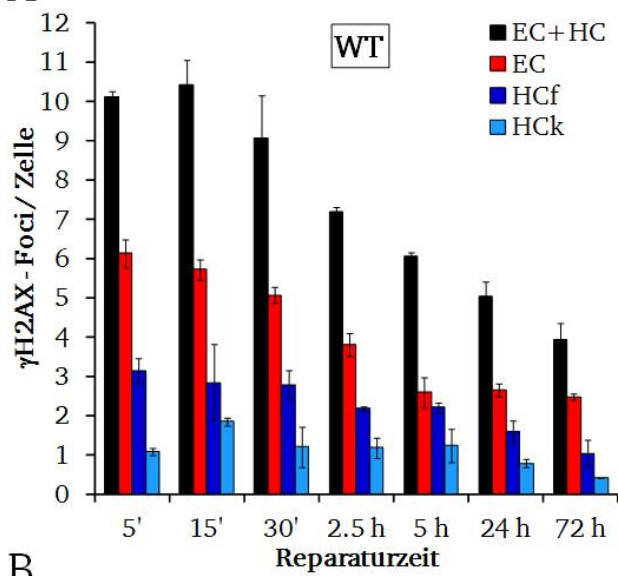
Die Stäbchen-PRs von AT-Mäusen weisen 5 min nach Bestrahlung mit 1 Gy durchschnittlich $\sim 5,5$ Foci auf (Abbildung 45, B). Davon sind etwa 69 % der γ H2AX-Foci im EC lokalisiert, ~ 28 % im HC_f und lediglich 3 % im HC_k. Die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle steigt bis zu 30 min nach Bestrahlung auf $\sim 7,5$ und ist ab einem Zeitpunkt von 2,5 h vergleichbar mit der Anzahl von γ H2AX-Foci in WT-Mäusen. Auch bei den AT-Mäusen ist im Verlauf der Reparatur tendenziell eine leichte prozentuale Abnahme an euchromatischen γ H2AX-Foci zu beobachten, während die heterochromatischen γ H2AX-Foci einen leichten Anstieg zeigen. Jedoch ist der prozentuale Anteil an

γ H2AX-Foci im EC im gesamten Reparaturverlauf in AT-Mäusen tendenziell etwas höher als bei WT-Mäusen, während der prozentuale Anteil an γ H2AX-Foci im HC_k etwas geringer ist.

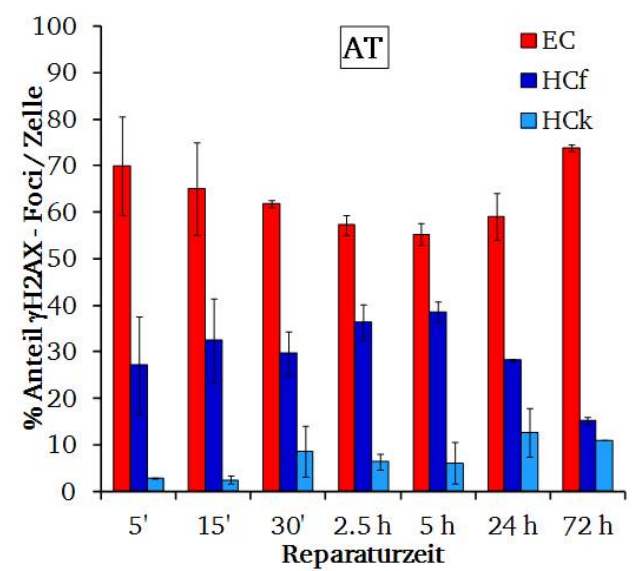
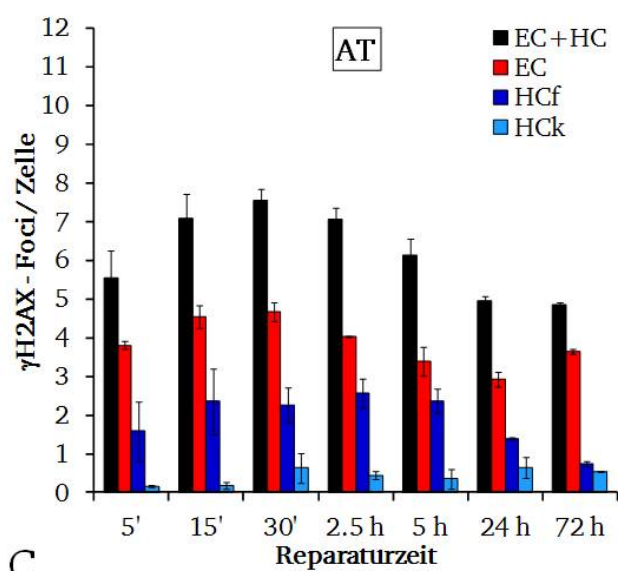
Bei den SCID-Mäusen werden in den Stäbchen-PRs 5 min nach Bestrahlung durchschnittlich $\sim 8,5$ γ H2AX-Foci pro Zelle ausgebildet (Abbildung 45, C). Davon liegen ~ 68 % der γ H2AX-Foci im EC, ~ 29 % im HC_f und ~ 3 % im HC_k. Nach 30 min sind durchschnittlich $\sim 10,9$ γ H2AX-Foci pro Zelle vorhanden. Der für DNA-PK-defiziente Zellen beschriebene Reparaturdefekt ist bereits 2,5 h nach Bestrahlung zu erkennen ($\sim 10,2$ γ H2AX-Foci pro Zelle). Auch 72 h nach Bestrahlung verbleiben noch $\sim 6,9$ γ H2AX-Foci pro Zelle. Die prozentuale Verteilung von γ H2AX-Foci innerhalb des Chromatins ändert sich im Verlauf der Reparatur kaum. Jedoch ist der prozentuale Anteil an γ H2AX-Foci im EC im gesamten Reparaturverlauf in SCID-Mäusen (ähnlich wie bei AT-Mäusen) tendenziell etwas höher als bei WT-Mäusen, während der prozentuale Anteil an γ H2AX-Foci im HC_k geringer ist.

Bei der Untersuchung der Lokalisation strahleninduzierter γ H2AX-Foci innerhalb des Chromatins von Stäbchen-PRs in WT-Mäusen konnte also festgestellt werden, dass im gesamten Verlauf der Reparatur prozentual meist etwas mehr γ H2AX-Foci in euchromatischen Bereichen (EC) lokalisiert sind als in heterochromatischen Bereichen (HC_f und HC_k). In den Stäbchen-PRs von AT- und SCID-Mäusen ist der prozentuale Anteil an γ H2AX-Foci im EC während des Reparaturverlaufs tendenziell etwas höher als beim WT, während der Anteil an γ H2AX-Foci im HC_k etwas geringer ist.

A



B



C

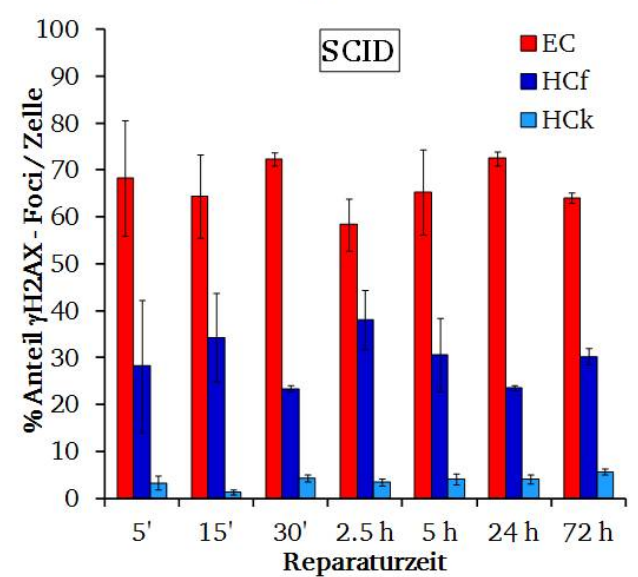
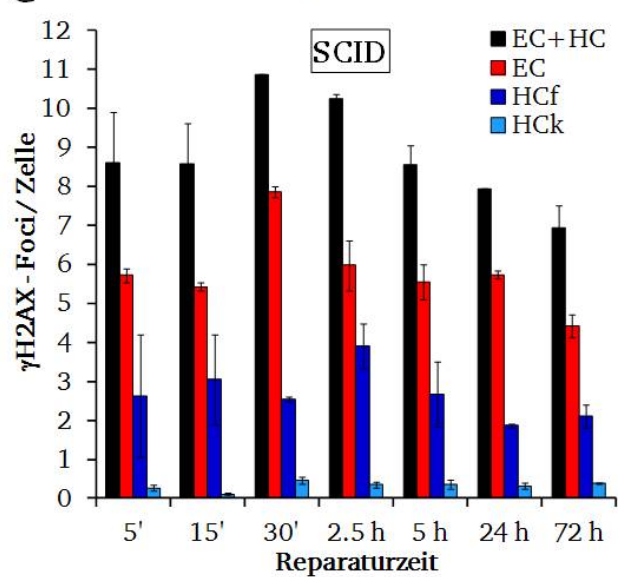


Abbildung 45: Untersuchung der Lokalisation von DSBs innerhalb des Chromatins von Stäbchen-Photorezeptoren der adulten Mausretina von WT-, AT- und SCID-Mäusen. Quantitative Analyse von γ H2AX-Foci pro Zelle in verschiedenen Chromatinregionen (EC=Euchromatin, HC_f= fakultatives Heterochromatin, HC_k= konstitutives Heterochromatin) der Stäbchen-PRs von WT-, AT- und SCID-Mäusen 5 min; 15 min; 30 min; 2,5 h; 5 h; 24 h und 72 h nach Bestrahlung mit 1 Gy. Bei der Darstellung der Ergebnisse wird sowohl die Anzahl der γ H2AX-Foci in den verschiedenen Chromatinregionen aufgeführt (links) als auch deren prozentuale Verteilung (rechts). Die durchschnittliche Anzahl an strahleninduzierten γ H2AX-Foci pro Zelle liegt 5 min nach Bestrahlung von WT-Mäusen bei etwa 10. Davon sind etwa 60 % der γ H2AX-Foci im EC lokalisiert, ~ 30 % im HC_f und ~ 10 % im HC_k. Im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung nimmt die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci ab. Nach 72 h sind noch etwa 40 % der initialen γ H2AX-Foci vorhanden. Die prozentuale Verteilung von γ H2AX-Foci innerhalb des Chromatins ändert sich im Verlauf der Reparatur kaum. Während zwischenzeitlich der prozentuale Anteil an euchromatischen γ H2AX-Foci im Vergleich zum initialen Zeitpunkt 5 min nach Bestrahlung tendenziell leicht abnimmt, steigt der von heterochromatischen γ H2AX-Foci leicht an. Bei den Stäbchen-PRs von AT-Mäusen sind 5 min nach Bestrahlung mit 1 Gy durchschnittlich etwa 5,5 γ H2AX-Foci pro Zelle vorhanden. Davon sind etwa 69 % der γ H2AX-Foci im EC lokalisiert, etwa 28 % im HC_f und lediglich ~ 3% im HC_k. Die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle steigt bis 30 min nach Bestrahlung auf ~ 7,5 an und ist ab einem Zeitpunkt von 2,5 h vergleichbar mit der von WT-Mäusen. Im Verlauf der Reparatur ist eine leichte prozentuale Abnahme an γ H2AX-Foci im EC zu beobachten, während die γ H2AX-Foci im HC einen leichten Anstieg zeigen. Der prozentuale Anteil an γ H2AX-Foci im EC ist im gesamten Reparaturverlauf bei AT-Mäusen tendenziell etwas höher als bei WT-Mäusen, während der im HC_k etwas geringer ist. In den Stäbchen-PRs von SCID-Mäusen werden 5 min nach Bestrahlung durchschnittlich etwa 8,5 γ H2AX-Foci pro Zelle ausgebildet. Davon liegen etwa 68 % im EC, ~ 29 % im HC_f und ~ 3 % im HC_k. Die Anzahl an γ H2AX-Foci steigt 30 min nach Bestrahlung auf etwa 11 an und sinkt im weiteren Verlauf der Reparatur nur langsam wieder ab. Nach 72 h nach Bestrahlung sind noch etwa 7 γ H2AX-Foci pro Zelle vorhanden. Die prozentuale Verteilung von γ H2AX-Foci innerhalb des Chromatins ändert sich während des Reparaturverlaufs kaum. Der prozentuale Anteil an γ H2AX-Foci ist jedoch im EC tendenziell etwas höher als bei WT-Mäusen, während der im HC_k geringer ist. Die Fehlerbalken stellen die Streuung zwischen den ermittelten Einzelwerten aus 2 unabhängigen Färbungen dar (n=1).

Es gibt Hinweise darauf, dass im HC erzeugte DSBs innerhalb von 5 min durch Chromatinmodulationen an die Grenze zum EC transportiert werden, wobei vermutlich erst dann die Phosphorylierung von H2AX nachgewiesen werden kann^{123,124}. Daher wurde die Lokalisation von γ H2AX-Foci in verschiedenen Chromatinbereichen von Stäbchen-PRs zusätzlich zu sehr frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung ermittelt. Diese Studien wurden mit Hilfe von Retina-Explantaten durchgeführt, da nur diese Form der Kultivierung die Analyse von γ H2AX-Foci unmittelbar nach Bestrahlung ermöglicht. Die Retina-Explantate wurden 90 min vor Bestrahlung mit DMSO, ATM-Inhibitor (ATMi)(10 μ m) oder DNA-PK-Inhibitor (DNA-PKi)(5 μ m) behandelt und anschließend mit 1 Gy bestrahlt. Die Fixierung der Retina-Explantate erfolgte 30 s, 1 min, 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h nach Bestrahlung.

Nach Behandlung der Retina-Explantate mit DMSO und Bestrahlung mit 1 Gy sind in den Stäbchen-PRs bereits nach 30 s ~ 4 γ H2AX-Foci pro Zelle vorhanden (Abbildung 46, A). Davon sind etwa 72 % der γ H2AX-Foci im EC lokalisiert, 27 % im HC_f und nur 1 % im HC_k. Im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung steigt die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle bis 15 min nach Bestrahlung auf ~ 9 an. Die Anzahl an γ H2AX-Foci der späteren Reparaturzeitpunkte (30 min- 8 h) ist vergleichbar mit der von Stäbchen PRs von WT-Mäusen nach *in vivo*-Bestrahlung. Die prozentuale Verteilung von γ H2AX-Foci ändert sich nach 1 min und 2 min nach Bestrahlung im Vergleich zu 30 s kaum. Ab einer Zeit von 5 min nach Bestrahlung nimmt der prozentuale Anteil an γ H2AX-Foci im EC ab (~ 54 %), während der im HC_f (~ 39 %) und im HC_k (~10 %) ansteigt. Im weiteren Verlauf der Reparatur ändert sich die prozentuale Verteilung der γ H2AX-Foci bis zu 8 h nach Bestrahlung wenig. Lediglich zu den späteren Zeitpunkten (1 h – 8 h) ist ein minimaler Anstieg an γ H2AX-Foci im HC_k zu beobachten. Die prozentuale Verteilung von γ H2AX-Foci innerhalb des Chromatins ist tendenziell ähnlich zu der von Stäbchen-PRs *in vivo*.

Wurden Retina-Explantate mit ATMi behandelt und anschließend mit 1 Gy bestrahlt, konnte innerhalb der ersten 2 min nach Bestrahlung keine Ausbildung von γ H2AX-Foci beobachtet werden (Abbildung 46, B). Nach 5 min sind durchschnittlich ~ 3,5 γ H2AX-Foci pro Zelle vorhanden, wovon etwa 60 % im EC, ~ 32 % im HC_f und ~ 8 % im HC_k lokalisiert sind. Im weiteren Verlauf steigt die Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle 10 min nach Bestrahlung auf etwa 7,5 an und zeigt bis 8 h nach Bestrahlung nur eine leichte Abnahme auf ~ 6. Die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci ist zu allen untersuchten Zeitpunkten ähnlich wie bei AT-Mäusen nach *in vivo*-Bestrahlung. Die prozentuale Verteilung von

γ H2AX-Foci innerhalb der verschiedenen Chromatinregionen verändert sich während des gesamten zeitlichen Verlaufs im Vergleich zum 5 min Zeitpunkt kaum. Lediglich eine tendenziell leichte Zunahme an γ H2AX Foci im HC_k und eine leichte Abnahme im HC_f ist zu beobachten. Die prozentuale Verteilung der strahleninduzierten γ H2AX-Foci auf die verschiedenen Chromatinregionen ist bei den mit ATMi behandelten Stäbchen-PRs ähnlich wie bei AT Mäusen. Der Anteil an im HC_k liegenden γ H2AX-Foci ist nach ATMi Behandlung tendenziell etwas höher.

Nach Behandlung der Retina-Explantate mit DNA-PKi und anschließender Bestrahlung mit 1 Gy sind 30 s nach Bestrahlung etwa 3,5 γ H2AX-Foci pro Zelle vorhanden (Abbildung 46, C). Davon befinden sich etwa 78 % im EC, \sim 20 % im HC_f und \sim 2 % im HC_k. Bis 5 min nach Bestrahlung steigt die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci nur leicht auf \sim 4,8 an, während nach 15 min ein Anstieg auf \sim 7 zu beobachten ist. Im folgenden Reparaturverlauf nimmt die Anzahl an γ H2AX-Foci nur leicht ab und liegt 8 h nach Bestrahlung noch bei \sim 6,5. Die ermittelten Werte der durchschnittlichen γ H2AX-Foci nach DNA-PKi-Behandlung liegen bei allen Zeitpunkten nach Bestrahlung deutlich unter denen von SCID-Mäusen. Die prozentuale Verteilung von γ H2AX Foci innerhalb verschiedener Chromatinregionen ist bei allen Zeitpunkten nach Bestrahlung ähnlich im Vergleich zum 30 s Zeitpunkt. Während die Anzahl an γ H2AX-Foci im EC im zeitlichen Verlauf etwas abnimmt, steigt die im HC_f leicht an. Obwohl sich die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci von SCID-Mäusen und von mit DNA-PKi behandelten Stäbchen-PRs stark unterscheidet ist die prozentuale Verteilung von γ H2AX-Foci in den verschiedenen Chromatinregionen tendenziell vergleichbar, wobei besonders der geringe prozentuale Anteil von γ H2AX-Foci im HC_k bei allen Zeitpunkten auffällt.

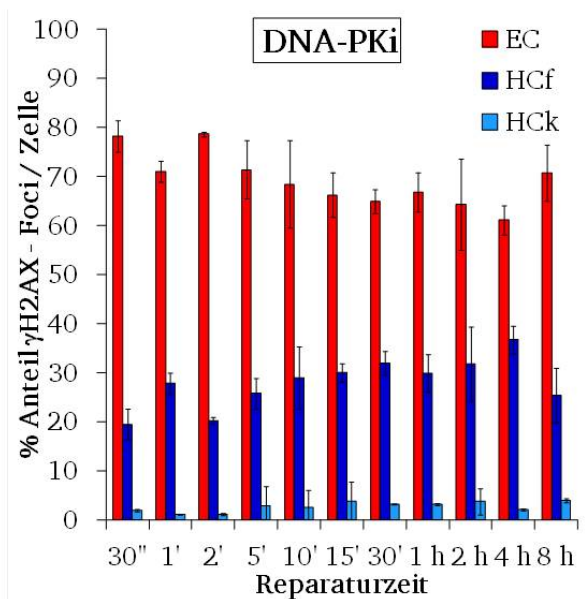
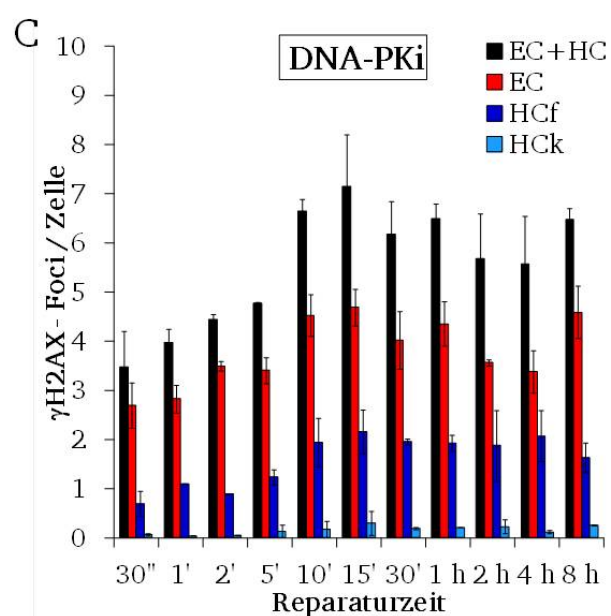
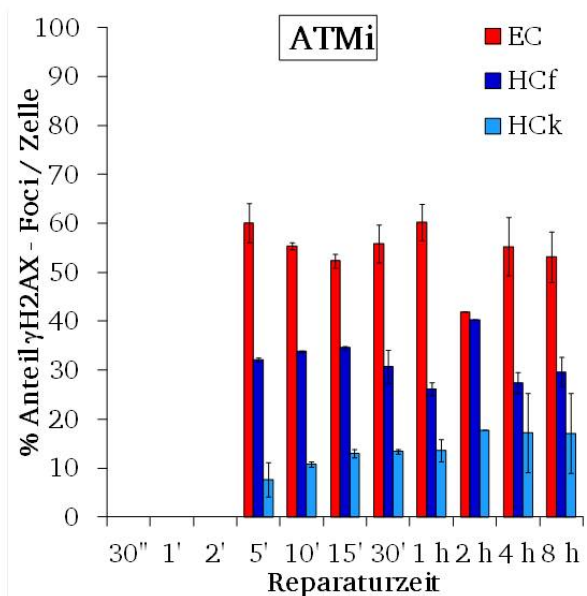
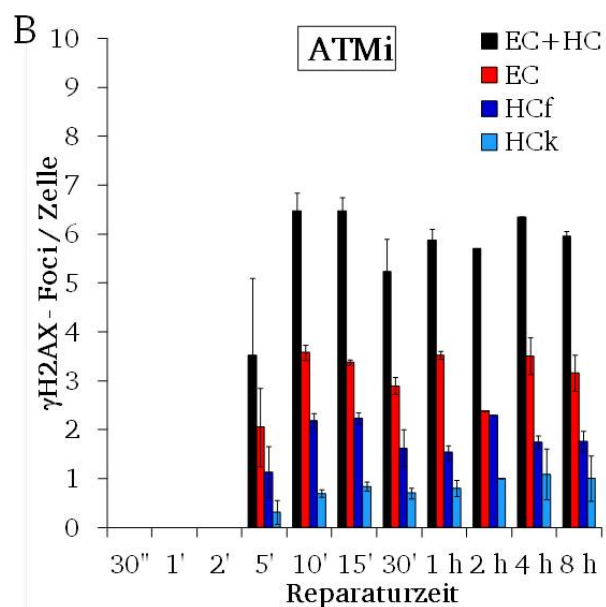
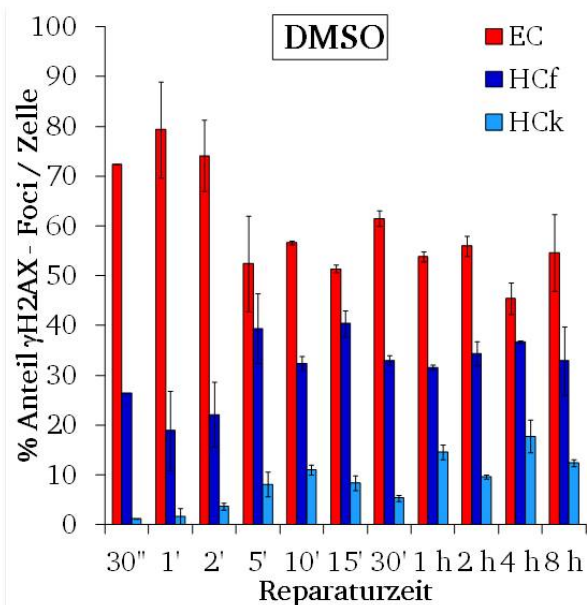
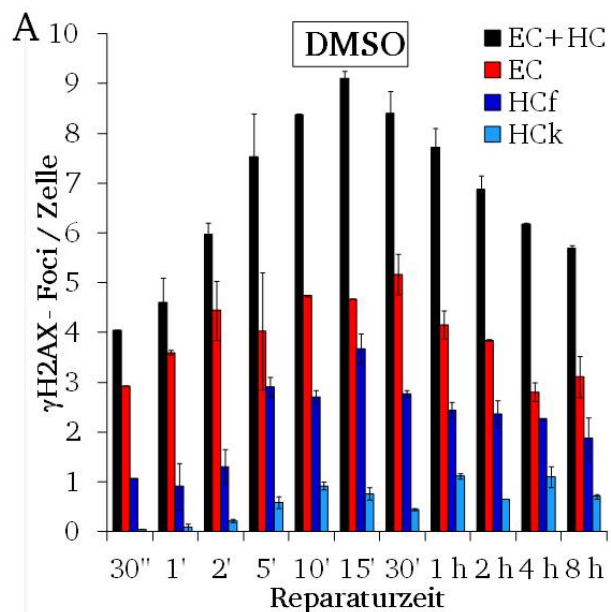


Abbildung 46: Untersuchung der Lokalisation von DSBs innerhalb des Chromatins von Stäbchen-Photorezeptoren in Retina-Explantaten adulter Mäuse nach DMSO, ATMi und DNA-PKi Behandlung. Quantitative Analyse von γ H2AX-Foci pro Zelle in verschiedenen Chromatinregionen (EC=Euchromatin, HC_f= fakultatives Heterochromatin, HC_k= konstitutives Heterochromatin) von Stäbchen-PRs von Retina-Explantaten adulter WT-Mäuse 30 s, 1 min, 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h; 2 h, 4 h und 8 h nach Bestrahlung mit 1 Gy. Die Explantate wurden vor Bestrahlung mit DMSO, ATMi oder DNA-PKi behandelt. Bei der Darstellung der Ergebnisse wird sowohl die Anzahl der γ H2AX-Foci in den verschiedenen Chromatinregionen aufgeführt (links) als auch deren prozentuale Verteilung (rechts). Nach DMSO-Behandlung sind in den Stäbchen-PRs 30 s nach Bestrahlung mit 1 Gy durchschnittlich etwa 4 γ H2AX-Foci pro Zelle vorhanden. Davon sind etwa 72 % der γ H2AX-Foci im EC lokalisiert, ~ 27 % im HC_f und lediglich 1 % im HC_k. Im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung steigt die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci bis 15 min nach Bestrahlung auf etwa 9 an. Die Anzahl an γ H2AX Foci der folgenden Reparaturzeiten (30 min - 8 h) ist vergleichbar mit der von Stäbchen-PRs von WT-Mäusen nach *in vivo*-Bestrahlung. Die prozentuale Verteilung von γ H2AX-Foci ändert sich bis 2 min nach Bestrahlung kaum. Ab einer Zeit von 5 min nach Bestrahlung nimmt der prozentuale Anteil an γ H2AX-Foci im EC ab (~ 54 %), während der im HC_f (~ 39 %) und im HC_k (~ 10 %) ansteigt. Im weiteren Reparaturverlauf ändert sich die prozentuale Verteilung nur wenig. Lediglich zu den späteren Zeitpunkten (1 h – 8 h) ist ein minimaler Anstieg an γ H2AX-Foci im HC_k zu beobachten. Nach Behandlung der Explantate mit ATMi konnte innerhalb der ersten 2 min nach Bestrahlung mit 1 Gy keine Ausbildung von γ H2AX-Foci beobachtet werden. Nach 5 min sind durchschnittlich ~ 3,5 γ H2AX-Foci pro Zelle vorhanden, wovon etwa 60 % im EC, ~ 32 % im HC_f und ~ 8 % im HC_k lokalisiert sind. Im weiteren Verlauf steigt die Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle 10 min nach Bestrahlung auf etwa 7,5 an und zeigt bis 8 h nach Bestrahlung nur einen leichte Abnahme auf ~ 6. Die prozentuale Verteilung von γ H2AX-Foci verändert sich innerhalb des Chromatins während des gesamten zeitlichen Verlaufs kaum im Vergleich zum 5 min Zeitpunkt. Lediglich eine tendenziell leichte Zunahme an γ H2AX Foci im HC_k und eine leichte Abnahme im HC_f ist zu beobachten. Nach Behandlung der Explantate mit DNA-PKi sind in den Stäbchen-PRs 30 s nach Bestrahlung mit 1 Gy durchschnittlich etwa 3,5 γ H2AX-Foci pro Zelle vorhanden. Davon befinden sich etwa 78 % im EC, ~ 20 % im HC_f und ~ 2 % im HC_k. Die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle steigt 15 min nach Bestrahlung auf etwa 7 an. Im folgenden Reparaturverlauf nimmt die Anzahl an γ H2AX-Foci nur leicht ab und liegt 8 h nach Bestrahlung noch bei ~ 6,5. Die prozentuale Verteilung von γ H2AX Foci innerhalb des Chromatins ist bei allen Zeitpunkten nach Bestrahlung ähnlich im Vergleich zum 30 s Zeitpunkt. Während die Anzahl an γ H2AX-Foci im EC im zeitlichen Verlauf etwas abnimmt, steigt die im HC_f leicht an. Die Fehlerbalken stellen die Streuung zwischen den ermittelten Einzelwerten aus 2 unabhängigen Färbungen dar (n=2).

4.10. Lokalisation von DSBs in Photorezeptoren der adulten Mausretina nach Schwerionenbestrahlung

Wie in Kapitel 4.9. gezeigt werden konnte, treten in den Stäbchen-PRs von Retina-Explantaten zu sehr frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung (30 s – 2 min) γ H2AX-Foci auf, welche überwiegend im Euchromatin (EC) lokalisiert sind, während im konstitutiven Heterochromatin (HC_k) kaum eine Ausbildung von γ H2AX-Foci zu beobachten ist. Erst 5 min nach Bestrahlung nimmt der Anteil an γ H2AX-Foci im EC ab, während im HC_k γ H2AX-Foci auftreten.

Es gibt Hinweise darauf, dass im HC erzeugte DSBs innerhalb von 5 min durch Chromatinmodulationen an die Grenze zum EC transportiert werden, wobei vermutlich erst dann die Phosphorylierung von H2AX nachgewiesen werden kann^{123,124}. Um zu untersuchen, ob auch bei Stäbchen-PRs der Mausretina, bei denen das konstitutive HC in einem einzelnen zentral im Zellkern gelegenen Chromocenter organisiert vorliegt, ein solcher Transport von DSBs innerhalb des Chromatins stattfindet, wurden Retina-Explantate mit Schwerionen (Titan) bestrahlt. Dafür wurden Retina-Explantate adulter WT-Mäuse mit ²²Ti-Ionen bestrahlt, welche eine Energie von 800 MeV/u (LET 128 keV/μm) aufwiesen. Die Bestrahlung mit ²²Ti-Ionen erfolgte bei einer Fluenz von $7,5 \cdot 10^6$ Teilchen/cm². Die Retina-Explantate wurden 5 min, 10 min, 15 min, 2 h und 8 h nach Bestrahlung fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden Paraffinschnitte der Explantate in Ausrichtung zur Teilchenspur angefertigt und mit Hilfe eines gegen γ H2AX-gerichteten Antikörper Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die DNA der Retina-Zellkerne wurde mit einem Farbstoff (DAPI) sichtbar gemacht, wobei heterochromatische Bereiche besonders intensiv gefärbt werden.

Die Titanteilchen durchdringen während der Bestrahlung die Explantate in einer linearen Flugbahn. Durch die Immunfluoreszenzfärbung von γ H2AX können die erzeugten DSBs entlang der Teilchenspur sichtbar gemacht werden. Nach der Bestrahlung von Retina-Explantaten mit ²²Ti-Ionen sind 5 min nach Bestrahlung in der Schicht der ONL γ H2AX-Foci zu beobachten, welche in linearen Spuren angeordnet vorliegen (Abbildung 47). Bereits 5 min nach Bestrahlung sind bei einzelnen Stäbchen-PRs

(ONL-Zoom), bei denen das Titan-Teilchen vermutlich das Chromocenter passiert hat, Biegungen der sonst linearen Spur von γ H2AX-Foci um den heterochromatischen Bereich herum zu beobachten. Bis 2 h nach Bestrahlung liegen die γ H2AX-Foci in der ONL in linear angeordneten Spuren vor. Die Größe der γ H2AX-Foci steigt mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung scheinbar an. Bei allen untersuchten Zeitpunkten zwischen 5 min und 2 h nach Bestrahlung sind in einzelnen Stäbchen-PRs, bei denen das linear verlaufende Titan-Teilchen vermutlich die heterochromatischen Bereiche passiert hat, gebogene Spuren von γ H2AX-Foci um diese Region herum zu beobachten. 8 h nach Bestrahlung sind in der ONL zwar noch zahlreiche γ H2AX-Foci vorhanden, jedoch sind diese nicht mehr in linearen Spuren angeordnet. Einzelne Zellen der ONL weisen zu diesem Zeitpunkt ein starkes in der Peripherie des Zellkerns liegendes γ H2AX-Signal auf.

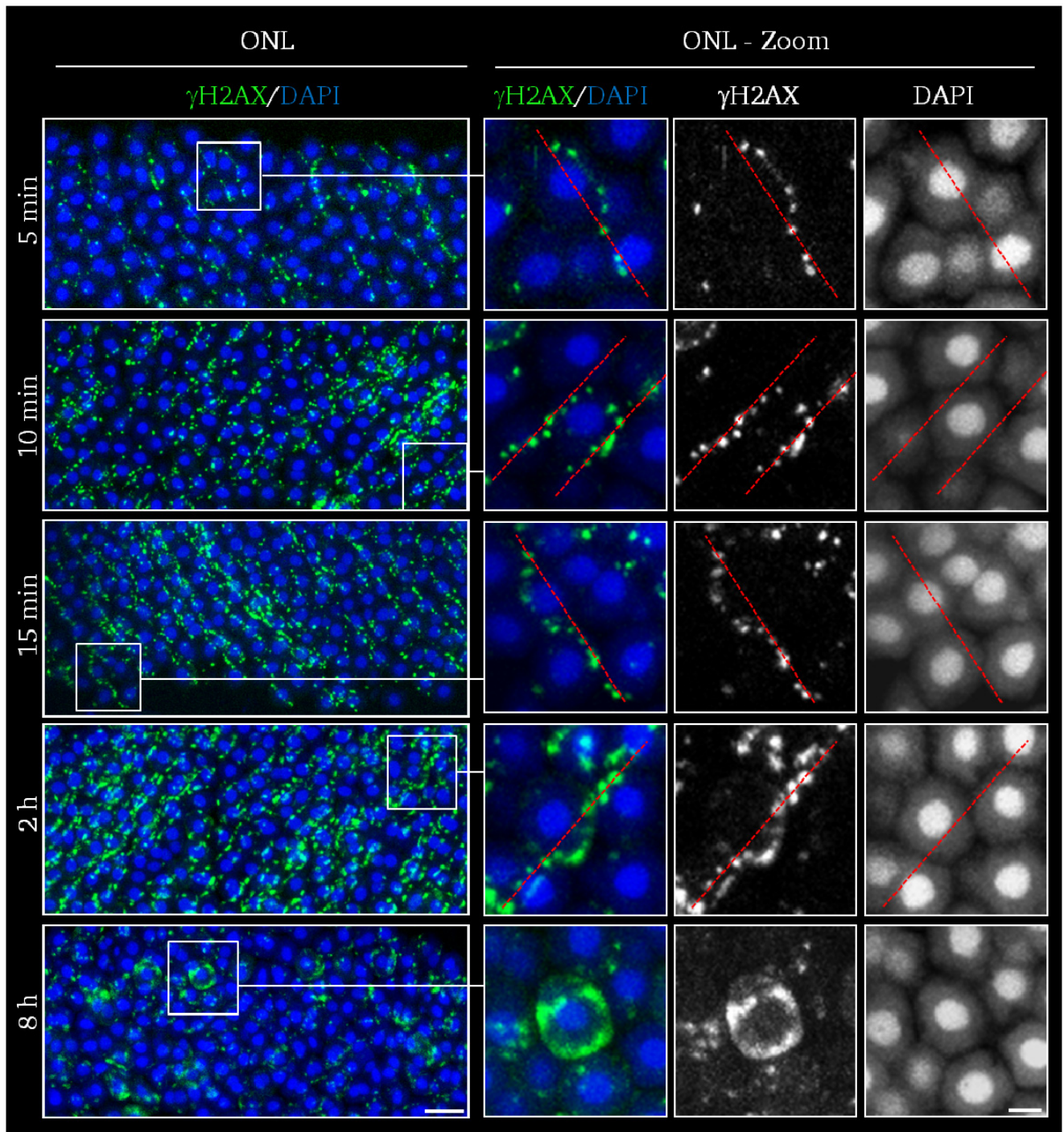


Abbildung 47: Auftreten von DSBs in der ONL der adulten Mausretina nach Bestrahlung von Retina-Explantaten mit Schwerionen (Titan). Immunfluoreszenzfärbung von DSBs mit Hilfe eines gegen γ H2AX-gerichteten Antikörpers in der ONL

der adulten Mausretina 5 min, 10 min, 15 min, 2 h und 8 h nach *ex vivo*-Bestrahlung von Retina-Explantate mit Schwerionen (Titan). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Nach Bestrahlung von Retina-Explantaten mit ^{22}Ti -Ionen sind in der ONL zwischen 5 min und 2 h nach Bestrahlung γH2AX -Foci zu beobachten, welche in linearen Spuren angeordnet vorliegen. Bei einzelnen Stäbchen-PRs (ONL-Zoom), bei denen das Titan-Teilchen vermutlich die heterochromatischen Bereiche des Zellkerns passiert hat, sind zu diesen Zeiten nach Bestrahlung Biegungen der sonst linearen Spur von γH2AX -Foci um den heterochromatischen Bereich herum zu beobachten. Die angenommene lineare Flugbahn des Titan-Ions wurde als rote Linie dargestellt. 8 h nach Bestrahlung sind in der ONL noch zahlreiche γH2AX -Foci vorhanden, welche jedoch keine lineare Anordnung mehr zeigen. Einzelne Zellen der ONL weisen ein starkes in der Peripherie des Zellkerns liegendes γH2AX -Signal auf. Maßstäbe: ONL 10 μm ; ONL-Zoom 2 μm .

5. DISKUSSION

In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass die Chromatinstruktur einen bedeutenden Einfluss auf die Erkennung und die Reparatur von DSBs hat. Die Mausretina weist im adulten Entwicklungsstadium Zellen mit unterschiedlichen Chromatinorganisationen auf, weshalb sie in dieser Arbeit als Modellorganismus für die Untersuchung der Erkennung, der Reparatur und der Lokalisation von DSBs gewählt wurde. Eine besondere Rolle spielen dabei die Stäbchen-Photorezeptoren (Stäbchen-PRs) der adulten Mausretina, bei denen das konstitutive Heterochromatin (HC) in einem einzigen zentral gelegenen Chromocenter angeordnet ist, an das sich das fakultative HC und peripher das Euchromatin (EC) anschließt¹⁸⁴. Durch diese invertierte Chromatinstruktur eignen sich die Stäbchen-PRs besonders gut zur Analyse der DNA-Schadenserkennung und der DSB-Reparatur innerhalb unterschiedlicher Chromatinbereiche.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass während der Entwicklung der Retina Unterschiede in der DNA-Schadensantwort auftreten. Während in der gesamten postnatalen Retina (P4) eine Akkumulation von pATM und 53BP1 an strahleninduzierte DSBs zu beobachten war, konnte in den Bipolarzellen, den Stäbchen-PRs und den Zapfen-PRs der adulten Mausretina keine effiziente Ausbildung von pATM- und 53BP1-Foci nachgewiesen werden. Jedoch zeigten ausschließlich die Stäbchen-PRs der adulten Retina, welche eine invertierte Chromatinstruktur aufweisen, einen Defekt bei der Reparatur strahleninduzierter DSBs. In den Vorläuferzellen der Stäbchen-PRs der postnatalen Retina, bei denen noch keine invertierte Chromatinstruktur vorhanden ist, konnte dagegen kein DSB-Reparaturdefekt beobachtet werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die fehlende Akkumulation von pATM und 53BP1 in den Retinazellen allein nicht zu einem Defekt bei der DSB-Reparatur führt, solange diese Zellen eine konventionelle Chromatinstruktur besitzen. Erst wenn die Zellen zusätzlich eine invertierte Chromatinorganisation aufweisen, wie sie in adulten Stäbchen-PRs zu finden ist, tritt ein DSB-Reparaturdefekt auf. Dieser Reparaturdefekt in den Stäbchen-PRs der adulten Retina korreliert sowohl mit der Chromatinstruktur als auch mit einer fehlenden Phosphorylierung von KAP1, welche bei der Reparatur heterochromatischer DSBs eine wichtige Rolle spielt.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit die Lokalisation strahleninduzierter γ H2AX-Foci innerhalb des Chromatins der Stäbchen-PRs während der Reparatur analysiert, wobei zusätzlich die Beteiligung der Kinasen ATM und DNA-PK bei der Phosphorylierung von H2AX innerhalb verschiedener Chromatin-Bereiche von Stäbchen-PRs untersucht wurde. Die aus dieser Arbeit resultierenden Befunde werden im Anschluss detailliert diskutiert.

5.1. Unterschiede in der DNA-Schadenserkennung in der adulten und postnatalen Mausretina

5.1.1. Fehlende Akkumulation von pATM und 53BP1 an strahleninduzierte DSBs in Bipolarzellen, Zapfen- und Stäbchen-PRs der adulten Mausretina

Zunächst wurde in der Retina adulter und postnataler Wildtyp (WT)-Mäuse die DNA-Schadenserkennung mit Hilfe verschiedener DNA-DSB-Marker wie γ H2AX, pATM und 53BP1, welche DSBs in der Immunfluoreszenzmikroskopie in Form von Foci markieren, untersucht^{59,60,62-65}. Dabei konnte in der unbestrahlten adulten Retina ein von basal zu apikal abnehmender Gradient von 53BP1-positiven Zellen beobachtet werden. Bei den 53BP1-positiven Zellen handelt es sich um Ganglienzellen, Amakrin-, Müller-Glia- und Horizontalzellen, welche 15 min nach Bestrahlung mit 1 Gy Röntgenstrahlung eine initiale Ausbildung von miteinander kolokalisierenden pATM- und 53BP1-Foci in den Zellkernen zeigen. Die 53BP1-negativen Zellen sind die Bipolarzellen der apikalen INL, sowie die Stäbchen- und Zapfen-PRs der ONL, bei denen keine strahleninduzierten pATM- oder 53BP1-Foci beobachtet werden konnten. Die Ausbildung strahleninduzierter γ H2AX-Foci findet dagegen in allen Zellen der adulten Retina statt.

In der unbestrahlten postnatalen Retina (P4) sind alle Zellen positiv für 53BP1, jedoch zeigen die Zellen, welche sich später in der adulten Retina zu 53BP1-negativen Zellen entwickeln, bereits ein schwächeres 53BP1-Signal. Im Vergleich zur adulten Retina werden in allen Zellen der postnatalen Retina strahleninduzierte pATM-, 53BP1- und γ H2AX-Foci ausgebildet.

Die fehlende Ausbildung strahleninduzierter pATM-Foci in bestimmten Zelltypen der adulten Retina war ein überraschendes Ergebniss, da das Vorkommen von ATM bereits für alle Zellen dieses Gewebes beschrieben wurde¹⁹⁵. Allerdings wurde in den Stäbchen-PRs lediglich eine zytoplasmatische Lokalisation von pATM postuliert. Deshalb sollte in weiteren Experimenten zunächst geklärt werden, ob die Phosphorylierung von ATM in den Zellkernen der Bipolarzellen, der Stäbchen-PRs und der Zapfen-PRs generell nicht stattfindet, oder ob lediglich die Rekrutierung von pATM an die DSBs unterbleibt.

Die Protein-Kinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), welche in der Zelle als inaktives Dimer vorliegt, wird nach Auftreten eines DSBs als eines der ersten Proteine an den DSB rekrutiert, wodurch es zur Autophosphorylierung von ATM am Ser1981 (pATM) und zur Dissoziation des Dimers in aktive Monomere kommt³⁸⁻⁴⁰. Des Weiteren spielt pATM während der Amplifikation des Schadenssignals eine Rolle, indem es zur Phosphorylierung zahlreicher H2AX-Moleküle am Ser139 (γ H2AX) über einen DNA-Bereich von bis zu 2 Megabasenpaaren beiträgt^{44,47,48}. In Studien mit ATM-*Knockout*-Zellen und ATM-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung von γ H2AX-Foci trotz des Fehlens von ATM zustande kommen kann, zu frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung (bis 10 min) jedoch verlangsamt abläuft^{43,196}. Die strahleninduzierte Phosphorylierung von H2AX in ATM-defizienten Zellen kann durch die Kinase DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) durchgeführt werden, da diese nach der Induktion von DSBs redundant zu ATM agieren kann¹⁹⁴. Die Ausbildung von γ H2AX-Foci in DNA-PK-defizienten Zellen ist zu frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung vergleichbar mit DNA-PK-profizienten bzw. mit WT-Zellen. Dies zeigt, dass die strahleninduzierte Phosphorylierung von H2AX zu frühen Zeitpunkten überwiegend von ATM durchgeführt wird, im Falle einer ATM-Defizienz jedoch durch DNA-PK kompensiert werden kann, obwohl die DNA-PK in Nager-Zellen in einem 50-fach reduzierten Level im Vergleich zu humanen Zellen vorhanden ist¹⁹⁷.

Im Vergleich zu diesen *in vitro*-Studien konnte in den Stäbchen- und Zapfen-PRs sowie in den Bipolarzellen von DNA-PK-defizienten SCID-Mäusen ebenfalls eine mit WT-Mäusen vergleichbare Anzahl strahleninduzierter γ H2AX-Foci beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass obwohl keine Akkumulation von pATM an den DSBs zu beobachten war, eine Phosphorylierung von ATM in diesen Zelltypen stattfindet. Dieses Ergebnis konnte auch in *ex vivo*-kultivierten Retina-Explantaten bestätigt werden, welche mit einem DNA-PK Inhibitor behandelt wurden.

Die Kinase ATR ist ebenfalls in der Lage H2AX zu phosphorylieren¹⁹⁸. Allerdings wird ATR im Gegensatz zu ATM und DNA-PK nicht durch DSBs aktiviert, sondern durch einzelsträngige DNA-Bereiche, welche in der S-Phase der Replikation oder bei der Resektion von DSBs in der G2-Phase entstehen können^{60,198-200}. Da sich alle Zellen der adulten Retina in einem ausdifferenzierten Zustand und somit in der G0/G1-Phase befinden, sollten in diesen Zellen ausschließlich ATM und/oder DNA-PK für die Phosphorylierung von H2AX im Bereich von DSBs verantwortlich sein¹⁹⁴. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ATR in bereits determinierten postmitotischen Vorläuferzellen von Stäbchen-PRs eine Rolle bei der Ausbildung des Ziliums (*connecting cilium*) spielt, welches das innere und äußere Segment der Stäbchen-PR verbindet²⁰¹. Diese Rolle ist so entscheidend, dass ein *Knockout* von ATR zur vollständigen Degeneration während der Entwicklung dieser Zellen führt. Um die Phosphorylierung von H2AX über ATR in der adulten Retina ausschließen zu können, wurden Versuche mit *ex vivo*-kultivierten Explantaten der adulten Retina durchgeführt, welche mit DNA-PK- und ATM-Inhibitoren behandelt wurden (Vor- und Nachteile des *ex vivo*-Systems werden in Kapitel 5.1.3. diskutiert). Nach Inhibition beider Kinasen wurden keine γ H2AX-Foci ausgebildet. Somit konnte auch in den Zellen der adulten Retina bestätigt werden, dass ausschließlich ATM und/oder DNA-PK für die Phosphorylierung von H2AX verantwortlich sind.

Durch die Untersuchung von pATM in Gesamtzellextrakten adulter Retinae konnte mit Hilfe der Western-Blot (WB)-Analyse ein deutlich schwächerer strahleninduzierter pATM-Level gezeigt werden als bei postnatalen Retinae, in denen die Ausbildung strahleninduzierter γ H2AX-, pATM- und 53BP1-Foci in allen Zellen der Retina beobachtet werden konnte (WB durchgeführt von Dr. Steffen C.

Naumann, Abbildung A1 im Anhang). Dies könnte darauf hindeuten, dass in den Bipolarzellen, den Stäbchen-PRs und den Zapfen-PRs nicht nur die Akkumulation von pATM am DSB beeinträchtigt ist, sondern dass auch die Phosphorylierung von ATM in diesen Zellen generell reduziert ist. Mit der Western-Blot-Methode können zwar keine Zelltyp-spezifischen Unterschiede sichtbar gemacht werden, jedoch unterstützen die Ergebnisse die durch die Immunfluoreszenzfärbungen gewonnenen Erkenntnisse.

Eine ähnliche Reduktion des pATM-Levels während der Differenzierung wurde bereits in ausdifferenzierten Astrozyten beschrieben. Die Astrozyten zeigen gegenüber ihren neuronalen Stammzellen eine sehr geringe strahleninduzierte ATM-Phosphorylierung²⁰². Hierbei resultiert die verminderte Phosphorylierung von ATM jedoch daraus, dass die Expression von ATM selbst während der Differenzierung der Astrozyten verloren geht. Ob dies auch in der Retina der Maus der Fall ist, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, da weder für die Immunfluoreszenzfärbung noch für die WB-Analyse ein geeigneter Antikörper zum Nachweis von unphosphoryliertem ATM für die Maus-Retinae gefunden wurde.

Im Gegensatz zu ATM, welches in den Bipolarzellen, den Stäbchen-PRs und den Zapfen-PRs der adulten Retina zwar nicht an DSBs akkumuliert aber in aktivierter Form vorhanden zu sein scheint, ist die fehlende Ausbildung von 53BP1-Foci vermutlich auf das in der Immunfluoreszenzmikroskopie beobachtete fehlende zelluläre Level von 53BP1 zurückzuführen, welches bereits in der unbestrahlten Retina beobachtet werden konnte. Das Fehlen von 53BP1 in diesen Zellen konnte zusätzlich indirekt durch die Untersuchung des 53BP1-Proteins in Gesamtzellextrakten adulter Retinae mit Hilfe der WB-Analyse bestätigt werden (WB durchgeführt von Dr. Steffen C. Naumann, Abbildung A1 im Anhang). Dabei konnte im Vergleich zu postnatalen Retinae ein verminderter 53BP1-Level nachgewiesen werden. Da die Akkumulation von 53BP1 am DSB für die effektive Akkumulation von pATM am Schadensort benötigt wird, könnte dies eine Erklärung für die fehlende Ausbildung von pATM-Foci in den Bipolarzellen, den Stäbchen-PRs und den Zapfen-PRs sein^{115,203}.

Bei der Quantifizierung von γ H2AX-Foci pro Zelle konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie nach Bestrahlung eine vergleichbare Anzahl an γ H2AX-Foci in allen adulten und allen postnatalen Retinazellen ermittelt werden. Die γ H2AX-Foci in der ONL der adulten Retina sind jedoch augenscheinlich etwas größer als in der postnatalen Retina, was vermutlich auf eine stärkere Phosphorylierung von H2AX-Histonen um den Bereich der einzelnen DSBs zurückzuführen ist. Dies konnte auch mit Hilfe der WB-Analyse gezeigt werden, bei der in Gesamtzellextrakten adulter Retinae ein im Vergleich zu Extrakten postnataler Retinae leicht erhöhter strahleninduzierter γ H2AX-Level zu beobachten war (WB durchgeführt von Dr. Steffen C. Naumann, Abbildung A1 im Anhang).

Des Weiteren stellte sich im Laufe der Untersuchung heraus, dass obwohl in den Bipolarzellen, den Stäbchen-PRs und den Zapfen-PRs initial keine Ausbildung strahleninduzierter pATM- und 53BP1-Foci nachgewiesen werden konnte, zu späteren Zeitpunkten nach Bestrahlung (2,5 h und 5 h) vorübergehend 53BP1-Foci auftraten. Diese 53BP1-Foci kolokalisieren mit γ H2AX-Foci, kommen jedoch in geringerer Anzahl vor. Daraus wurde geschlossen, dass das 53BP1-Protein in diesen Zellen nicht vollständig fehlt, sondern in verminderter Konzentration vorliegt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass erst durch die Bestrahlung eine verstärkte Expression von 53BP1 in diesen Zelltypen ausgelöst wird. In wie weit auch pATM zu diesen Zeitpunkten an den DSBs akkumuliert, wurde nicht untersucht. Da für eine effektive Akkumulation von pATM am DSB jedoch 53BP1 benötigt wird, kann erwartet werden, dass die verzögert auftretenden 53BP1-Foci auch jeweils mit pATM-Foci kolokalisieren^{115,203}.

5.1.2. Annahmen zur Entstehung des 53BP1-Gradienten in der adulten Mausretina

In dieser Arbeit konnte ein sich im Laufe der Entwicklung herausbildender räumlicher Gradient für die Expression des 53BP1-Proteins in der Mausretina nachgewiesen werden. Dies ist deshalb von Bedeutung, da 53BP1-defiziente Zellen nicht nur eine erhöhte genomische Instabilität, sondern auch eine gesteigerte Strahlensensitivität aufweisen²⁰⁴⁻²⁰⁷. Es ist unklar, welcher Mechanismus für die Entstehung eines 53BP1-Gradienten in der Mausretina während der postnatalen Entwicklung

verantwortlich ist. Aufgrund zeitlicher und räumlicher Parallelen könnte die Reihenfolge der Entstehung bestimmter Zelltypen oder auch die Schichtenbildung innerhalb der Retina mit der Ausbildung dieses Gradienten zusammenhängen. So zeigen die während der embryonalen Entwicklung zuerst geborenen Ganglienzellen, welche sich in der adulten Retina in der basal liegenden GCL befinden, einen hohen zellulären 53BP1-Level bzw. die Ausbildung strahleninduzierter 53BP1-Foci¹⁸⁰. Die ebenfalls embryonal geborenen Amakrinzellen, welche sich in der adulten Retina in der basalen INL befinden, sowie die in der mittleren INL liegenden Müller-Gliazellen, welche während der frühen postnatalen Entwicklung entstehen, zeigen ebenfalls einen hohen zellulären 53BP1-Level. Jedoch ist anzumerken, dass nach Bestrahlung in den später geborenen Müller-Gliazellen augenscheinlich weniger 53BP1-Foci ausgebildet werden als in Amakrinzellen. Mittels der Immunfluoreszenzmikroskopie konnte bei den Bipolarzellen, die während der postnatalen Entwicklung zuletzt geboren werden und sich in der adulten Retina in der apikalen INL befinden, kein zellulärer 53BP1-Level und keine initiale Ausbildung strahleninduzierter 53BP1-Foci ausfindig gemacht werden. Somit korreliert die 53BP1-Expression gleichzeitig mit dem Geburtszeitpunkt, aber auch mit der Lage des Zelltyps in der inneren Retina. Eine Ausnahme bilden dabei die embryonal entstehenden Horizontalzellen, welche in der adulten Retina einen hohen zellulären 53BP1-Level und eine Ausbildung strahleninduzierter 53BP1-Foci aufweisen, sich jedoch in der apikalen INL befinden. Für die Vorläufer der Horizontalzellen ist bekannt, dass die Mitose dieses Zelltyps im Gegensatz zu allen anderen Zelltypen der Retina im basalen Teil der embryonalen Retina stattfindet²⁰⁸. Erst nach der Mitose migriert dieser Zelltyp in die apikale INL. Da die Genexpression von Zellen direkt durch den zellulären Kontakt mit benachbarten Zellen bzw. durch diffundierende Faktoren zwischen den Zellen beeinflusst werden kann, wäre es möglich, dass die in der embryonalen Entwicklung basal liegenden Ganglien- und Amakrinzellen, welche auch später einen 53BP1-Level aufweisen, einen Einfluss auf die spätere Expression von 53BP1 in den Horizontalzellen haben^{209,210}. In der ONL der adulten Retina zeigen weder die Stäbchen-PRs noch die Zapfen-PRs einen zellulären 53BP1-Level. Während die Stäbchen-PRs embryonal und postnatal geboren werden, entstehen die Zapfen-PRs ausschließlich embryonal. In der ONL könnte also mehr die apikale Lage der Zellen ausschlaggebend für das Fehlen von zellulärem 53BP1 sein als der Geburtszeitpunkt. Daraus kann geschlossen werden, dass sowohl die Reihenfolge der Entstehung bestimmter Zelltypen während der Entwicklung als auch die Lage der Zelltypen in den verschiedenen Schichten eine Rolle bei der Entstehung des in der adulten Retina auftretenden 53BP1-Gradienten spielen könnte.

In einer Studie zur neuronalen Entwicklung im Vorderhirn embryonaler Mäuse konnte ebenfalls ein zur adulten Retina ähnlicher Gradient von 53BP1-positiven Zellen nachgewiesen werden. Hierbei zeigten Zellen der IZ (*intermediate zone*) und der CP (*cortical plate*) im Vergleich zu Zellen der SVZ (*subventricular zone*) oder der VZ (*ventricular zone*) einen höheren zellulären 53BP1-Level und eine stärkere Entwicklung strahleninduzierter 53BP1-Foci²¹¹. Allerdings handelt es sich bei den Zonen des embryonalen Gehirns, in denen kein 53BP1 vorkommt, um replizierende Zellen. Die 53BP1-positiven Zonen enthalten dagegen Zellen, die bereits differenziert sind.

5.1.3. Vor-und Nachteile *ex vivo*-kultivierter Retina-Explantate

Um die Beteiligung von Kinasen bei der Phosphorylierung von H2AX genauer analysieren zu können wurden *ex vivo*-kultivierte Retina-Explantate adulter WT-Mäuse verwendet. Diese Form der Kultivierung ermöglicht die Untersuchung von Retina-Explantaten nach Behandlung mit Kinase-Inhibitoren (ATMi und DNA-PKi). Die geeigneten Inhibitor-Konzentrationen wurden zuvor mit Hilfe der γ H2AX-Foci-Analyse in *in vitro*-kultivierten Maus-Fibroblasten ermittelt.

In der Immunfluoreszenzmikroskopie *ex vivo*-bestrahlter Retina-Explantate adulter WT-Mäuse konnte in den Stäbchen-PRs 15 min nach Bestrahlung die Ausbildung zahlreicher γ H2AX-Foci beobachtet werden. In den Zellen der INL und der GCL von Retina-Explantaten konnten dagegen nur wenig strahleninduzierte γ H2AX-Foci nachgewiesen werden. Der Grund dafür könnte die bei der Herstellung von Retina-Explantaten durchgeführte Durchtrennung des optischen Nervs sein, welcher aus den Fortsätzen der Ganglienzellen besteht. Es konnte gezeigt werden, dass die Ganglienzellen einige Tage nach Durchtrennung des optischen Nervs nicht nur Absterben, sondern dass dieser Vorgang in den

Retina-Explantaten auch zu einer direkten Veränderung in der Expression zahlreicher Gene führen kann²¹²⁻²¹⁵. Ebenso konnte festgestellt werden, dass von dieser veränderten Gen-Expression auch Zellen betroffen sind, die im direkten Kontakt mit den Ganglienzellen stehen^{216,216,217,217}. Es wäre also möglich, dass die geringe Ausbildung von γ H2AX-Foci in den Zellen der INL und GCL von Retina-Explantaten auf beginnende Apoptosevorgänge und eine veränderte Genexpression in den betroffenen Zelltypen hindeuten, die durch die Durchtrennung der Ganglienzellfortsätze hervorgerufen werden. Da in den Stäbchen-PRs beim Vergleich von *ex vivo*-bestrahlten Retina-Explantaten mit *in vivo*-bestrahlten Retinae nach Bestrahlung jedoch etwa gleich viele γ H2AX-Foci pro Zelle ermittelt werden konnten, scheinen diese Zellen in den Retina-Explantaten zu den untersuchten Kultivierungszeiten noch vollständig intakt zu sein. Somit stellen die Retina-Explantate ein gut geeignetes *ex vivo*-System für den Einsatz von Inhibitoren dar um die Beteiligung von Kinasen bei der H2AX-Phosphorylierung zu untersuchen.

5.2. Unterschiede in der DSB-Reparatur in der adulten und postnatalen Mausretina

5.2.1. Defekt der DSB-Reparatur in Stäbchen-PRs der adulten Mausretina korreliert mit einer verminderten KAP1-Expression und dem Fehlen einer strahleninduzierten Phosphorylierung von KAP1

Es ist bekannt, dass in G1-Phase-Zellen mit einer ATM- oder 53BP1-Defizienz nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung 10-25 % der initial erzeugten DSBs unrepariert verbleiben^{79,115,173}. Des Weiteren konnte für ATM-defiziente Zellen gezeigt werden, dass die verbleibenden γ H2AX-Foci, welche die unreparierten DSBs repräsentieren, 24 h nach Bestrahlung zu 80 % an der Peripherie des HCs lokalisiert sind^{79,110,115}. Daraus wurde geschlossen, dass die Reparatur von DSBs im HC ATM-abhängig ist.

Da bei der Untersuchung der DNA-Schadenserkennung im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass in den Bipolarzellen, den Stäbchen-PRs und den Zapfen-PRs der adulten Retina keine initiale Ausbildung strahleninduzierter pATM- und 53BP1-Foci erfolgt und ein deutlich reduzierter pATM- und 53BP1- Level im Vergleich zu postnatalen Retinae vorliegt, wurde in diesen Zelltypen eine beschränkte Reparaturkapazität strahleninduzierter DSBs vermutet. Entgegen den Erwartungen zeigen jedoch ausschließlich die Stäbchen-PRs 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy Röntgenstrahlung einen Reparaturdefekt, der durch das Verbleiben von ~ 50 % der initial erzeugten γ H2AX-Foci gekennzeichnet ist. Die eingeschränkte Reparaturkapazität der Stäbchen-PRs konnte bis zu 144 h nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Alle anderen Zelltypen der Retina, sowie Zellen der Niere und des Gehirns, zeigen eine nahezu vollständige und miteinander vergleichbare Reparatur (90-95%), welche in der Literatur bereits für Zellen der Niere und des Gehirns beschrieben wurde^{63,160}.

Mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) konnte bestätigt werden, dass es sich bei den nach Bestrahlung verbleibenden γ H2AX-Foci tatsächlich um unreparierte DSBs handelt und nicht um eine Beeinträchtigung bei der Dephosphorylierung von γ H2AX. Durch die PFGE können gebrochene DNA-Fragmente gemessen werden, welche dem direkten Nachweis von DSB dienen^{63,190}. Damit bei der PFGE 24 h nach Bestrahlung noch verbleibende DNA-Fragmente nachgewiesen werden können, wurden Retina-Explantate und zum Vergleich zusätzlich Gehirn-Explantate mit 20 Gy bestrahlt. Die FAR-Werte, die bei der Auswertung der PFGE-Gele ermittelt werden, spiegeln die Quantität von gebrochenen DNA-Fragmenten wider. Diese Werte zeigten, dass die initial erzeugten Fragmente in den Explantaten adulter Retinae 24 h nach Bestrahlung mit 20 Gy zu ~ 50 % verbleiben. Im Gehirn konnten dagegen nur ~ 15 % verbleibende Fragmente ermittelt werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit dem Verhältnis der Anzahl an verbleibenden γ H2AX-Foci in der adulten Retina, welche bei der Immunfluoreszenzmikroskopie beobachtet werden konnten. Da die Stäbchen-PRs 80 % der Gesamtzellen der adulten Retina ausmachen und in diesem Zelltyp ~ 50 % der initial erzeugten γ H2AX-Foci 24 h nach Bestrahlung verblieben, sind ~ 40 % der verbleibenden Fragmente bei der PFGE den Stäbchen-PRs zuzuordnen^{180,193}. Die restlichen 20 % der Zellen der adulten Retina zeigen in der Immunfluoreszenzmikroskopie einen prozentualen Anteil von 10 % an verbleibenden γ H2AX-Foci und würden somit bei der PFGE einen Anteil von ~ 2 % der verbleibenden Fragmente ausmachen. Somit

zeigt sich eine deutliche Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil an verbleibenden Fragmenten bei der PFGE und dem von verbleibenden γ H2AX-Foci in der Immunfluoreszenzmikroskopie.

Obwohl in den Stäbchen-PRs von WT-Mäusen eine zumindest geringe ATM-Aktivität angenommen werden kann, welche die Phosphorylierung von H2AX in DNA-PK-defizienten SCID-Mäusen ermöglicht, zeigen die Stäbchen-PRs adulter WT-Mäuse einen mit den Stäbchen-PRs von AT-Mäusen vergleichbaren Reparaturdefekt. Das Ausmaß des Reparaturdefekts ist auch vergleichbar mit dem in anderen Zelltypen der adulten Retina von AT-Mäusen (INL, Zapfen-PRs) und dem in Zellen der Niere von AT-Mäusen. Diese Ergebnisse sind konsistent mit einer anderen Studie, bei der in verschiedenen Organen von AT-Mäusen ein zur Retina vergleichbarer Reparaturdefekt gezeigt werden konnte¹⁶⁰. Aus welchem Grund der Reparaturdefekt in allen Geweben von AT-Mäusen zwischen 40-60 % liegt ist unklar, da in bisherigen *in vitro* Studien mit AT-Zellen ein Defekt von 10-25% beschrieben wurde^{79,115,173}.

Die Ursache den DSB-Reparaturdefekt, welcher ausschließlich in den Stäbchen-PRs beobachtet wurde, konnte nicht allein auf die fehlende Akkumulation von pATM- oder 53BP1 an den DSBs zurückgeführt werden, da diese auch in den Bipolarzellen und den Zapfen-PRs zu beobachten war. Die Stäbchen-PRs der adulten Retina weisen im Gegensatz zu den Bipolarzellen und den Zapfen-PRs zusätzlich eine invertierte Chromatinstruktur auf^{184,186}. Diese Zelltyp-spezifische Struktur entsteht dadurch, dass die Expression des Lamin B-Rezeptors (LB-R) im postnatalen Stadium (P15-P16) verloren geht und eine Expression von Lamin A/C während der gesamten Entwicklung vollständig ausbleibt¹⁸⁶. Da Lamin A/C und/oder der LB-R essentiell für die Anheftung des HCs an die Peripherie des Zellkerns sind, in den Stäbchen-PRs der adulten Retina jedoch beides fehlt, ist das konstitutive HC in diesen Zellen in einem einzigen zentral gelegenen Chromocenter angeordnet. Das EC ist in der Peripherie der Zellkerne lokalisiert.

Da der Reparaturdefekt strahleninduzierter DSBs in den Stäbchen-PRs adulter WT-Mäuse mit deren Chromatinstruktur korreliert, wurde das Vorhandensein des HC-bildenden Faktors KAP1 untersucht, welcher ein entscheidender *Downstream*-Faktor von pATM bei der Reparatur heterochromatischer DSBs ist¹¹⁴. KAP1 wird nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung durch pATM am Serin824 phosphoryliert (pKAP1) und somit inaktiviert, was zu einer lokalen Öffnung des HCs führt¹¹⁰. Dadurch wird die Reparatur heterochromatischer DSBs erleichtert^{110,218}. In ATM-defizienten Zellen kommt der DSB-Reparaturdefekt folglich u.a. dadurch zustande, dass die Reparatur heterochromatischer DSBs durch die fehlende Inaktivierung von KAP1 und somit durch die fehlende Öffnung des HCs verhindert wird. Dieser Defekt kann in ATM-defizienten Zellen durch einen *Knockdown* von KAP1 aufgehoben werden^{78,110}.

Bei der Untersuchung von KAP1 konnte im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, dass die Stäbchen-PRs, welche als einzige Zellen der adulten Retina eine invertierte Chromatinstruktur und einen Reparaturdefekt strahleninduzierter DSBs aufweisen, im Vergleich zu den restlichen Zelltypen der Retina ein stark vermindertes nukleäres KAP1-Signal in der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigen. Von noch größerer Bedeutung ist die Beobachtung, dass eine strahleninduzierte Phosphorylierung von KAP1 in den Stäbchen-PRs nicht stattfindet, während die restlichen Zelltypen der Retina ein nukleäres pKAP1-Signal aufweisen. Auch in den Bipolarzellen und in den Zapfen-PRs, welche keine Akkumulation von pATM an den DSBs zeigen, jedoch einen zumindest geringen pATM-Level besitzen, konnte die Phosphorylierung von KAP1 gezeigt werden. Auch in allen Zellen der postnatalen Retina (P4) inklusive der Vorläuferzellen der Stäbchen-PRs, welche eine konventionelle Chromatinstruktur besitzen und keine eingeschränkte Reparaturkapazität strahleninduzierter DSBs zeigen, konnte KAP1, sowie dessen strahleninduzierte Phosphorylierung nachgewiesen werden.

Die aus der Immunfluoreszenzmikroskopie gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit konnten mit Hilfe der WB-Analyse bestätigt werden. Dabei konnte in Gesamtzellextrakten adulter und postnataler Retinae ebenfalls ein stark verminderter KAP1-Level in den adulten Retinae beobachtet werden, welcher vermutlich ausschließlich auf die verminderte KAP1-Expression in den Stäbchen-PRs zurückzuführen ist, da diese etwa 80 % der gesamten Zellen der adulten Retina ausmachen¹⁹³ (WB durchgeführt von Dr. Steffen C. Naumann, Abbildung A2 im Anhang). In den adulten Retinae konnte des Weiteren kaum eine Phosphorylierung von KAP1 nachgewiesen werden, während die postnatalen Retinae einen deutlichen strahleninduzierten pKAP1-Level zeigten (WB durchgeführt von Dr. Steffen

C. Naumann, Abbildung A2 im Anhang). Das noch vorhandene pKAP1 in den adulten Retinae ist vermutlich den Zellen der INL und der GCL zuzuordnen.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass der generell niedrige KAP1-Level, sowie die fehlende Phosphorylierung von KAP1 für die beschränkte Reparaturkapazität von DSBs in den Stäbchen-PRs der adulten Retina verantwortlich ist, da die restlichen Zelltypen der adulten Retina keinen Reparaturdefekt, sowie eine Phosphorylierung von KAP1 aufweisen. Die Zellen, bei denen ebenso wie in den Stäbchen-PRs keine initiale Ausbildung strahleninduzierter pATM und 53BP1-Foci, sowie eine verzögerte Rekrutierung von 53BP1 zu den DSBs beobachtet werden konnte, zeigen eine direkte strahleninduzierte Phosphorylierung von KAP1, wodurch die Reparatur der DSBs vermutlich ermöglicht wird.

Es ist erstaunlich, dass in den Stäbchen-PRs adulter WT-Mäuse trotz einer geringen KAP1-Konzentration ein dicht gepacktes HC vorliegt. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der in ATM-defizienten Zellen auftretende Reparaturdefekt heterochromatischer DSBs durch einen *Knockdown* von KAP1 aufgehoben werden kann ^{78,110}. In diesen Studien wird angenommen, dass durch den *Knockdown* von KAP1 kein kompaktes HC gebildet wird, eine strahleninduzierte Phosphorylierung von KAP1 somit nicht stattfinden kann und pATM für die Auflockerung des HCs folglich nicht benötigt wird. In den Stäbchen-PRs liegt das HC jedoch trotz vermindertem KAP1- und fehlendem pKAP1-Level in hoch konzentrierter Form vor. Da KAP1, sowie dessen phosphorylierte Form nach Bestrahlung in allen Zellen der postnatalen Retina vorkommt, kann vermutet werden, dass KAP1 in den Stäbchen-PRs zwar im Laufe der Entwicklung eine Rolle bei der Entstehung des konzentrierten HCs spielt, nach Ausbildung der invertierten Chromatinstruktur jedoch nicht mehr benötigt und dessen Expression folglich herab reguliert wird. Eine im Laufe der Entwicklung der Mausretina ähnliche Reduktion des Protein-Levels konnte kürzlich für das ebenfalls HC-bildende Protein HP1 α gezeigt werden, welches ein wichtiger Interaktionspartner von KAP1 ist ²¹⁹. Im Gegensatz zur Reduktion des KAP1-Levels konnte mit Hilfe der WB-Analyse gezeigt werden, dass Histonmodifikationen wie H3K9me3 und H4K20me3, welche spezifisch für HC sind, während der Entwicklung ein vergleichbares Expressionslevel aufweisen (WB durchgeführt von Dr. Steffen C. Naumann, Abbildung A2 im Anhang). Wie es zu einer Aufrechterhaltung von HC ohne das Vorhandensein des HC-bildenden Faktors KAP1 kommen kann ist bis heute noch unklar. Jedoch könnte man darüber spekulieren, dass durch die stark reduzierte Expression von KAP1 eine Auflockerung des HCs in den Stäbchen-PRs der Retina adulter Mäuse verhindert werden soll, da die konzentrierte Form des HCs in diesem Zelltyp bei nachtaktiven Tieren eine Rolle beim Sehen im Dunkeln zu spielen scheint. So konnte gezeigt werden, dass die invertierte Chromatinorganisation in den Stäbchen-PRs zahlreicher nachtaktiver Tiere als eine Art konvexe Linse dient, wodurch eine bessere Fokussierung des Lichts und eine geringere Lichtstreuung zustande kommen ¹⁸⁴. Das Licht muss die gesamte Retina passieren bevor es die lichtsensitiven äußeren Segmente der PRs erreicht. Daher sind die Stäbchen-PRs in der ONL adulter Mäuse hintereinander in Kolonnen angeordnet, welche symmetrisch entlang der Achse der physiologischen Richtung des Lichteinfalls orientiert sind. Das Aufeinanderfolgen von mehreren „konvexen Linsen“ hat zur Folge, dass beim Durchgang des Lichtes durch die gesamte ONL eine Reduktion der Lichtstreuung und somit ein verbessertes Sehen erreicht wird. Auf Grund dieser Funktion des konzentrierten HCs beim Sehen wäre es vorstellbar, dass die Chromatinstruktur in den Stäbchen-PRs adulter Mäuse nicht verändert werden soll und deshalb die Aktivierung von KAP1, welche zur Auflockerung des HCs führen würde, in diesen Zellen durch eine verminderte Expression von KAP1 bzw. durch dessen fehlende Phosphorylierung unterdrückt wird. In wie weit weitere HC-bildende Faktoren bzw. Chromatinmodulierer in den Stäbchen-PRs der adulten Retina eine verminderte oder fehlende Expression zeigen bleibt zu klären.

Ein weiterer überraschender Befund bei der Analyse von KAP1 und pKAP1 in Zellen der Retina adulter und postnataler Mäuse war deren generelle Lokalisation im EC, da in *in vitro*-kultivierten menschlichen und murinen G1-Phase-Zellen sowie in anderen differenzierten Zellen eine hohe Konzentration von KAP1 im HC gezeigt werden konnte ^{220,221}. KAP1 spielt jedoch nicht nur bei der Bildung von HC und bei der Reparatur heterochromatischer DSBs eine Rolle, sondern auch bei der Regulation der Proliferation und Differenzierung von Zellen während der Entwicklung ²²². Während in embryonalen Stammzellen das KAP1 diffus im Zellkern verteilt ist, liegt dieses nach der

Differenzierung der Zellen in hoher Konzentration im HC vor und kolokalisiert mit dem HC- bildenden Protein HP1 (*Heterochromatin protein 1*)²²³. Aus welchem Grund die differenzierten Zellen der adulten Retina aber auch die Zellen der postnatalen Retina eine hohe Konzentration von KAP1 im EC aufweisen bleibt unklar. Die Verlagerung von KAP1 in die euchromatischen Bereiche scheint sich in den Zellen der Retina erst im Laufe der Entwicklung Zelltyp-abhängig auszubilden, da in den Zellen des umliegenden Gewebes der postnatalen Retina KAP1 noch überwiegend in den heterochromatischen Bereichen lokalisiert ist, während in der adulten Retina KAP1 in diesen umliegenden Zellen überwiegend in euchromatischen Bereichen zu finden ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die beschränkte Reparaturkapazität strahleninduzierter DSBs in den Stäbchen-PRs der adulten Retina vermutlich allein auf einem verminderten KAP1-Level bzw. auf der fehlenden Phosphorylierung von KAP1 beruht. Es kann angenommen werden, dass durch die fehlende Phosphorylierung von KAP1 keine Öffnung des HCs und somit keine Reparatur heterochromatischer DSBs in den Stäbchen-PRs der adulten Retina stattfindet. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass ~ 50 % der initial erzeugten DSBs in den Stäbchen-PRs unrepariert verbleiben und dieser Wert mit dem prozentualen Anteil an HC in diesen Zellen korreliert¹⁸⁷. Es könnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es in diesen Zellen auf einem anderen Weg zu einer Öffnung des HCs kommt. Aufgrund der konzentrierten Form des HCs in den Stäbchen-PRs könnte auch eine stark verlangsamte Reparatur angenommen werden, da die Reparatur heterochromatischer DSBs bereits in Zellen mit einer konventionellen Chromatinstruktur um 50 % langsamer abläuft als die euchromatischer DSBs¹¹⁰.

5.2.2. Der DSB-Reparaturdefekt in Stäbchen-PRs der adulten Mausretina im Kontext zu Laminopathien

Die Ergebnisse zur DNA-Schadenserkennung und Reparatur von DSBs in den Lamin A/C-defizienten Stäbchen-PRs der adulten Retina sind unter anderem deshalb relevant, da Mutationen des *Lmna*-Gens, welches für die A-Typ-Lamine kodiert, im Zusammenhang mit einer Vielzahl von degenerativen Erkrankungen stehen (Laminopathien)^{133,135}. Die A-Typ-Lamine (Lamin A/C) haben gemeinsam mit anderen Protein-Komplexen einen Einfluss auf die Regulation der nukleären Struktur und Funktion^{134,136-139,143}. Bei einigen Mutationen des *Lmna*-Gens, sowie bei Zellen in denen ein *Knockout* des *Lmna*-Gens (*Lmna*^{-/-}) vorliegt, konnte eine abnormale Chromatinorganisation nachgewiesen werden, welche sich in einer Ablösung des HCs von der Kernlamina und/oder einer partiellen Fusion einzelner Chromocenter äußert^{139,140}. Im Gegensatz zu den Stäbchen-PRs konnte in diesen Zellen aber bislang keine vollständig invertierte Chromatinstruktur beobachtet werden. In dermalen Hautfibroblasten von HGPS (*Hutchinson Gilford Progeria Syndrome*)-Patienten, in denen eine Mutation des *Lmna*-Gens vorliegt, sowie in *Lmna*^{-/-} MEFs (*mouse embryonic fibroblastes*), konnte jedoch ähnlich wie bei den Stäbchen-PRs der adulten Retina eine verzögerte Rekrutierung von 53BP1 (sowie von NBS1 und Mre11) festgestellt werden^{136,139,149}. Ebenso konnte mit Hilfe der WB-Analyse ein verminderter zellulärer 53BP1-Level in *Lmna*^{-/-} MEFs beobachtet werden, welcher auf der Degradierung des 53BP1-Proteins durch Proteasomen beruht und welcher für die verzögerte Rekrutierung von 53BP1 verantwortlich gemacht wird¹⁴³. Der Grund für die Degradierung von 53BP1 liegt in der durch den *Knockout* von Lamin A hervorgerufenen, verstärkten Expression der Cystein-Protease Cathepsin L (CTSL)²²⁴. Diese Protease, welche der Papain-Familie angehört, wird vorwiegend im Zellkern sekretiert, wo sie spezifisch nukleäre Komponenten prozessieren kann²²⁵. Eine dieser Komponenten ist das 53BP1-Protein, welches durch CTSL abgebaut wird²²⁴. Eine gezielte Verringerung der Expression von CTSL in Lamin A-defizienten Zellen führt zu einer Angleichung des 53BP1-Level auf den von Lamin A-profizienten Zellen.

Im Gegensatz zu den ebenfalls Lamin A/C-defizienten Stäbchen-PRs zeigen dermale Hautfibroblasten von HGPS-Patienten und *Lmna*^{-/-} MEFs zu späteren Zeiten nach Bestrahlung jedoch eine vollständige Rekrutierung von 53BP1 (sowie von NBS1 und Mre11) zu den bereits ausgebildeten γ H2AX-Foci. Dass die verzögerte Rekrutierung von 53BP1 in den Stäbchen-PRs unvollständig und nur vorübergehend ist, könnte mit einer vergleichsweise stärkeren Reduktion des zellulären 53BP1-Levels zu erklären sein.

Im Vergleich zu dermalen Hautfibroblasten von HGPS-Patienten und *Lmna*^{-/-} MEFs konnte auch in den Bipolarzellen und in den Zapfen-PRs, welche in der adulten Retina Lamin A/C exprimieren, ein verminderter zellulärer 53BP1-Level und eine verzögerte Rekrutierung von 53BP1 (und eventuell auch von pATM) beobachtet werden. Somit können der verminderte 53BP1-Level und die verzögerte Rekrutierung von 53BP1 zumindest in den Bipolarzellen und in den Zapfen-PRs nicht ausschließlich auf das Fehlen von Lamin A zurückgeführt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die bereits erwähnte Protease CTSL sein. Da gezeigt werden konnte, dass eine gezielte Überexpression von CTSL in Lamin A-profizienten WT-Zellen zu einer verminderten 53BP1-Expression führt, könnte eine verstärkte Lamin A-unabhängige CTSL-Expression in den Bipolarzellen und in den Zapfen-PRs für die Reduktion des 53BP1-Level verantwortlich sein ²²⁴. Tatsächlich konnte bereits in Studien zur Verteilung von CTSL-mRNA im Gehirn von Ratten gezeigt werden, dass die Expression dieses Proteins auf bestimmte Regionen des Gehirns beschränkt ist ²²⁶. In einer weiteren Studie konnte eine vom Entwicklungsstadium und vom Zelltyp abhängige Regulation der mRNA dieses Proteins in den Hodenkanälchen, der Niere und der Leber nachgewiesen werden ²²⁷. Somit ist auch eine, sich im Laufe der Entwicklung ausbildende, Zelltyp-spezifische Expression dieses Proteins in der Retina nicht auszuschließen.

In den Zellen, in denen ein Lamin A/C *Knockout* oder eine Mutation des *Lmna*-Gens vorliegt, konnte ebenso wie bei den Lamin A/C negativen Stäbchen-PRs der adulten Mausretina ein Reparaturdefekt strahleninduzierter DSBs in Form verbleibender γ H2AX-Foci beobachtet werden ^{135,139,148,149}. Der Grund für den auftretenden Reparaturdefekt wird in Zusammenhang mit der in diesen Zellen auftretenden, verzögerten Rekrutierung von 53BP1 diskutiert, welche auch in den Stäbchen-PRs beobachtet werden konnte. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl die Bipolarzellen als auch die Zapfen-PRs der adulten Retina, welche ebenfalls eine verzögerte Rekrutierung von 53BP1 aufweisen, in der Lage sind, nahezu alle strahleninduzierten DSBs vollständig zu reparieren. Wie bereits in Kapitel 5.2.1. erwähnt, scheint der Grund für die beschränkte Reparaturfähigkeit der Stäbchen-PRs die fehlende Phosphorylierung des HC-bildenden Faktors KAP1 zu sein, was zu einem Defekt in der Reparatur heterochromatischer DSBs führt. Auch der in Lamin A *Knockout*-Zellen beschriebene Reparaturdefekt strahleninduzierter DSBs könnte entgegen bisheriger Annahmen nicht auf der verzögerten Rekrutierung von 53BP1 beruhen, sondern auf einer fehlenden Phosphorylierung von KAP1. Für diese Zellen konnte zwar im Gegensatz zu den Stäbchen-PRs eine initiale Ausbildung von pATM beobachtet werden, sollte jedoch KAP1 als Substrat von pATM hier nicht oder nur begrenzt vorhanden sein, kann dieses auch nicht aktiviert werden ¹¹⁴. In kürzlich durchgeführten Studien mit Lamin A-defizienten MEFs konnte auch in diesen Zellen die fehlende Phosphorylierung von KAP1 bestätigt werden (vorläufige Daten). In wie weit auch andere Zellen, in denen ein Lamin A/C *Knockout* oder eine Mutation des *Lmna*-Gens vorliegt, eine fehlende KAP1-Phosphorylierung aufweisen, bleibt zu klären.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Lamin A-defiziente Stäbchen-PRs der adulten Retina ähnliche Defekte in der DSB-Erkennung und Reparatur aufweisen wie Zellen in denen ein *Knockout* oder eine Mutation des *Lmna*-Gens vorliegt. Diese Zellen zeigen ähnlich wie die Stäbchen-PRs der adulten Retina eine veränderte Chromatinorganisation, da durch den Verlust von Lamin A die Anheftung des HCs an die Kernmembran nicht zustande kommt. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass im Vergleich zu Lamin A-defizienten Zellen auch Lamin A-profiziente Zellen wie die Bipolarzellen und die Zapfen-PRs der adulten Retina eine verzögerte Rekrutierung von Reparaturfaktoren zu strahleninduzierten DSBs aufweisen, scheint dieses Phänomen zumindest in den Zellen der adulten Retina keine Auswirkung der Lamin A-Defizienz zu sein. Der Defekt in der DSB-Reparatur könnte jedoch mit dem Verlust von Lamin A in Zusammenhang stehen, da ausschließlich in den Lamin A-defizienten Stäbchen-PRs der adulten Retina, sowie in Zellen in denen ein *Knockout* oder eine Mutation des *Lmna*-Gens vorliegt eine fehlende Phosphorylierung des HC-bildenden Faktors KAP1 beobachtet werden konnte, welche für die Reparatur heterochromatischer DSBs benötigt wird.

5.2.3. Der DSB-Reparaturdefekt in Stäbchen-PRs der adulten Mausretina im Kontext zur Sensitivität dieses Zelltyps gegenüber oxidativem Stress

Die Zellen der Retina, insbesondere die Photorezeptoren (PRs), sind aufgrund ihrer Funktion der Wahrnehmung und Umwandlung visueller Stimuli, zeitlebens einer erhöhten Lichtexposition und somit einem erhöhtem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ausgesetzt. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Licht-Stress nach dem Überschreiten eines bestimmten Schwellenwerts zunächst zur Degeneration der PRs und später auch zur Degeneration der restlichen Zellen in diesem Gewebe führt^{228,229}. Dass dieser Effekt auf einen erhöhten ROS-Level zurückzuführen ist, zeigen Studien, bei denen eine Degeneration durch Antioxidantien bzw. Radikalfängern reduziert bzw. verhindert werden kann^{228,229}.

Auch andere Faktoren wie z.B. chemische Agenzien können zu einem erhöhten ROS-Stress in der Retina führen und deren Degeneration auslösen. Dazu gehört auch das DNA-alkylierende Agens *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU), das spezifisch zu einem Absterben der PRs führt^{230,231}. Dieses spezifische Absterben konnte auf eine ausschließlich in diesem Zelltyp auftretende DNA-Basen-Schädigung (7-Methyldeoxyguanosine) zurückgeführt werden^{232,233}.

Aufgrund der Empfindlichkeit der Retina gegenüber ROS-Stress zu dem zusätzlich endogen erhöhten ROS-Level ist es erstaunlich, dass die adulte Retina gegenüber ionisierender Strahlung, bei der es ebenfalls zur Bildung von ROS kommt, sehr resistent ist^{234,235}. Während die Bestrahlung postnataler Mäuse noch zu einem massiven, ATM-abhängigen Absterben nicht ausdifferenzierter Zellen in der Retina durch Apoptose führt, zeigt die Bestrahlung adulter Mäuse keinen Einfluss auf das Überleben ausdifferenzierter retinaler Neurone bzw. ausdifferenzierter Photorezeptoren²³⁶⁻²³⁹. Interessanterweise entwickelt sich diese Resistenz im gleichen Zeitraum, indem im Rahmen dieser Arbeit sowohl eine verminderte Reparaturkapazität strahleninduzierter DSBs als auch eine veränderte Erkennung von DSBs durch pATM und 53BP1 beobachtet werden konnte.

Somit stellt sich die Frage, welche Unterschiede es zwischen Licht- und MNU-bedingtem Stress gegenüber strahleninduziertem ROS-Stress gibt, die die unterschiedliche Sensitivität von Zellen der Retina erklären könnten. Der Lichtstress führt neben dem ROS-Stress zusätzlich zu einer Überstimulation des Chromophors 11-cis-Retinal, welches sich in den Sehfärbstoffen (Rhodopsin/Opsin) der Stäbchen- und Zapfen-PRs befindet. Dabei wird, durch Licht gebleichtes, Retinal aus dem Rhodopsin bzw. Opsin freigesetzt und anschließend wieder in 11-cis-Retinal umgewandelt. Wird dieser Zyklus während einer andauernden Lichtexposition inhibiert, kommt es nicht zur Degeneration der Retina^{228,229}. Im Gegensatz zum Lichtstress sollte die Exposition mit ionisierender Strahlung nicht zu einer solchen Überstimulation der Chromophore führen, wodurch die geringere Sensitivität erklärt werden könnte. Die MNU-abhängige Degeneration von Stäbchen-PRs findet bereits nach einer einmaligen Gabe von MNU innerhalb von nur wenigen Tagen statt²⁴⁰. Innerhalb des gleichen Zeitraums konnten im Rahmen dieser Arbeit nach ionisierender Strahlung zwar verbleibende DSBs, aber keine Anzeichen für eine Degeneration von Stäbchen-PRs festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Effekte könnte die bereits erwähnte selektive DNA-Basen-Schädigung (7-Methyldeoxyguanosine) in PRs nach MNU-Behandlung sein, welche eine Degeneration auslösen könnte.

5.2.4. Relevanz des DSB-Reparaturdefekts in Stäbchen-PRs der adulten Mausretina für den Menschen

Ein entscheidendes Ergebnis dieser Arbeit war, dass die Stäbchen-PRs adulter Mäuse einen bislang unbekannten Defekt in der Reparatur strahleninduzierter DSBs aufweisen. Dieses Ergebnis ist aus folgenden Gründen auch für den Menschen relevant. Die Behandlung von Erblindungskrankheiten wie altersbedingte Makuladegeneration, Diabetis oder Glaukome, welche auf eine Degeneration der Retina zurückzuführen sind, stellen ein schwerwiegendes Problem dar. Über die pathogenen Mechanismen, welche diese Degenerationen hervorrufen, ist bislang nur wenig bekannt, wobei umweltbedingten Faktoren wie z. B. eine verstärkte Lichtexposition dabei eine wichtige Rolle zugesprochen wird²⁴⁰. Die Degeneration der Retina ist nach dem Einsetzen einer solchen Krankheit nur bedingt therapierbar.

Dementsprechend ist das Ziel zahlreicher wissenschaftlicher Studien das bessere Verständnis der Mechanismen, welche für eine Degeneration der Retina verantwortlich sind. Für diese Studien stellt die Retina von nachtaktiven Nagern bislang ein zentrales Modellsystem dar^{232,234,236,237,240}. Dabei werden sowohl Lichtstress als auch das DNA-alkylierende Agens MNU verwendet, welche ein Absterben von PRs herbeiführen, um die Degeneration der Retina einzuleiten. Allerdings sind die PRs nachaktiver Tiere deutlich sensibler gegenüber diesen beiden Stressoren als die von tagaktiven Tieren²⁴⁰. Mögliche Ursachen dafür könnten die in dieser Arbeit gezeigten Zelltyp-spezifischen Veränderungen in der DNA-Schadenserkennung sowie der in Stäbchen-PRs adulter Mäuse auftretende Defekt in der Reparatur von DSBs sein, welche auch bei Lichtstress und Einsatz von MNU relevant sein können. Der DSB-Reparaturdefekt wurde jedoch auf die besondere Chromatinstruktur der Stäbchen-PRs adulter Mäuse zurückgeführt. Es ist unwahrscheinlich, dass diese Phänomene auch in den Stäbchen-PRs tagaktiver Tiere und somit auch in den menschlichen PRs auftreten, da diese eine konventionelle Chromatinstruktur aufweisen. Dementsprechend müssen die aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse in Zukunft bei der Interpretation von Studien, die anhand von Mausmodellen durchgeführt wurden, berücksichtigt werden.

5.3. Bewegung strahleninduzierter DSBs innerhalb des Chromatins von Stäbchen-Photorezeptoren der adulten Mausretina nach Schwerionenbestrahlung

In vorangegangenen Studien wurde postuliert, dass im HC erzeugte strahleninduzierte DSBs an die Grenze zum EC transportiert werden, damit diese für die Reparatur besser zugänglich sind^{109,113,114,123,124}.

Um herauszufinden, ob auch in Stäbchen-PRs ein Transport heterochromatischer DSBs stattfindet, wurden Retina-Explantate adulter Mäuse mit Titanionen am Teilchenbeschleuniger der GSI (Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH in Darmstadt) bestrahlt. Die invertierte Chromatinstruktur der Stäbchen-PRs adulter Mäuse, bei denen das HC in einem einzigen zentral lokalisiertem Chromocenter vorliegt, macht diesen Zelltyp zu einem besonders geeigneten Modellsystem für die Analyse von solchen Transportvorgängen^{184,187}.

Durch die Schwerionenbestrahlung kann aufgrund der linearen Flugbahn der Ionen die ursprüngliche Lage der erzeugten DSBs ermittelt und ein möglicher Transport verfolgt werden. Die in der Schicht der Stäbchen-PRs durch die Bestrahlung erzeugten DSBs entlang der linearen Teilchenspur konnten mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie von γ H2AX sichtbar gemacht werden. Dabei muss erwähnt werden, dass nach Schwerionenbestrahlung komplexere Schäden entstehen als nach Röntgenstrahlung und die induzierten γ H2AX-Foci somit nicht einzelne DSBs sondern sogenannte Schadenscluster darstellen²⁴¹⁻²⁴³. Bei der Analyse von γ H2AX-Foci fiel auf, dass nach Bestrahlung nahezu alle γ H2AX-Foci in euchromatischen Bereichen der Zellkerne lokalisiert waren. Des Weiteren sind nicht alle γ H2AX-Foci exakt entlang der linearen Flugbahn der Ionen angeordnet. An den Stellen, an denen ein Ion das Chromocenter eines Stäbchen-PRs durchdrungen haben muss, konnte eine Biegung der sonst linear verlaufenden Spur von γ H2AX-Foci um das Chromocenter herum beobachtet werden. Diese Biegungen konnten bereits bei dem frühesten untersuchten Zeitpunkt von 5 min bis 2 h nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Zu späten Zeiten nach Bestrahlung (8 h) konnten immer noch zahlreiche γ H2AX-Foci beobachtet werden, jedoch sind diese nicht mehr in linearen Spuren angeordnet.

Es ist eher unwahrscheinlich, dass die nicht exakt entlang der linearen Teilchenspuren auftretenden γ H2AX-Foci durch Delta-Elektronen zustande kommen, welche sich bei der Teilchenbestrahlung stochastisch um die Flugbahn des Ions ausbreiten und in benachbarten Zellen sekundäre DSBs hervorrufen können. Deshalb kann in den Stäbchen-PRs eine Relokalisation der im HC erzeugten DSBs an die Grenze zum EC vermutet werden, da die γ H2AX-Foci bei den Biegungen sehr symmetrisch um das HC eines Zellkerns angeordnet sind.

Es kann also festgehalten werden, dass in den Stäbchen-PRs adulter WT-Mäuse bereits 5 min nach Bestrahlung ein Transport von DSBs aus dem HC stattgefunden hat. Es bleibt jedoch offen, ob es sich hierbei um einen Transport aller heterochromatischer DSBs handelt oder ob sich ein Teil der heterochromatischen DSBs zu diesem Zeitpunkt noch im HC befindet, da in manchen Studien das HC

als eine Barriere für die Phosphorylierung von H2AX beschrieben wird^{110,244-246}. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von H2AX zu sehr frühen Zeiten im HC stattfinden kann, gefolgt von einem schnellen Transport an die Grenze zum EC^{124,125}. Aus diesem Grund resultiert die Annahme, dass das HC die Phosphorylierung von H2AX verhindert, wahrscheinlich daraus, dass der Transport von DSBs in den erwähnten Studien zu den beobachteten Zeitpunkten bereits abgeschlossen war und somit lediglich außerhalb des HCs eine Phosphorylierung von H2AX beobachtet werden konnte. Die im HC auftretende Phosphorylierung von H2AX konnte zu sehr frühen Zeiten nach Bestrahlung mit Schwefel- oder Gold-Ionen in Maus-Fibroblasten nachgewiesen werden¹²⁴. In dieser Studie wird ebenfalls gezeigt, dass 3-8 min nach Bestrahlung noch 66 % der γ H2AX-Foci im HC lokalisiert sind, während nach 14-20 min noch lediglich 30 % zu beobachten waren. Dieser Befund deutet auf einen Transport der im HC erzeugten DSBs an die Grenze zum EC hin. Ebenso konnte in *Drosophila*-Zellen innerhalb von wenigen Minuten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung die Ausbildung von γ H2Av-Foci im HC beobachtet werden, welche sich nach Auflockerung von heterochromatischen HP1 α -Domänen an deren Peripherie befinden¹²⁵. Eine Untersuchung der Lokalisation von γ H2AX-Foci zu früheren Zeitpunkten (vor 5 min) nach Bestrahlung wäre hilfreich, um auch in den Stäbchen-PRs ein eventuell frühes Auftreten von γ H2AX-Foci im HC bestätigen zu können, und somit genauere Aussagen über deren Relokalisation zu treffen. Dies war aufgrund der experimentellen Durchführung und technischen Gegebenheiten der Bestrahlungsanlage jedoch nicht möglich.

Da die Stäbchen-PRs im Vergleich zu Fibroblasten deutlich größeres und dicht gepackteres HC besitzen ist es generell erstaunlich, dass bereits nach 5 min ein Transport von DSBs nach Schwerionenbestrahlung beobachtet werden konnte. Diese Beobachtung unterstützt die These von Jakob *et al.* (2011), dass es sich bei dem Transport von DSBs weniger um einen von ATP-abhängigen, enzymatisch getriebenen Prozess, sondern vermutlich eher um einen spontanen Reorganisationsprozess ohne enzymatische Beteiligung handelt¹²⁴. Dabei wird angenommen, dass die aus der Schwerionenbestrahlung resultierende Relaxation des HCs im Bereich des Schadens energetisch unvorteilhaft ist, wodurch Spannungen im HC entstehen. Diese werden letztendlich dadurch abgebaut, dass die Stelle des Schadens an die Peripherie des HCs relokiert wird.

5.4. Lokalisation von DSBs innerhalb verschiedener Chromatinbereiche von Stäbchen-PRs der adulten Mausretina nach Röntgenbestrahlung

Um genauere Einblicke in die Rolle des Chromatins bei der Erkennung und Reparatur von DSBs *in vivo* zu erhalten, wurde in Stäbchen-PRs adulter WT-Mäuse die Lokalisation strahleninduzierter DSBs mittels der γ H2AX Foci Analyse innerhalb verschiedener Chromatinbereiche nach Röntgenbestrahlung untersucht. Hierbei wurden zusätzlich zu *in vivo*-bestrahlten Mäusen *ex vivo*-kultivierte Retina-Explantate verwendet, welche nach Röntgenbestrahlung zu sehr frühen Zeiten fixiert und analysiert werden können. Bei diesen Untersuchungen muss bedacht werden, dass nicht bei allen initial erzeugten strahleninduzierten DSBs eine Ausbildung von γ H2AX-Foci stattfindet, da DSBs bereits innerhalb der ersten Minuten nach Bestrahlung auch ohne die Phosphorylierung von H2AX durch die schnelle Reparaturkomponente repariert werden können^{60,61}.

Die Lokalisationsanalyse zeigte, dass bereits 30 s nach Bestrahlung insgesamt 50 % der später auftretenden strahleninduzierten γ H2AX-Foci vorhanden waren, welche fast ausschließlich im EC aber auch im HCf lokalisiert sind. Ab 2 min nach Bestrahlung konnten dagegen auch γ H2AX-Foci im HCk beobachtet werden. Dieser Befund lässt vermuten, dass das HCk in den Stäbchen-PRs eine Barriere für die Phosphorylierung von H2AX darstellt. Tatsächlich konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass zwischen 15 min und 1 h nach Bestrahlung keine strahleninduzierte Phosphorylierung von H2AX im HCk festgestellt werden konnte^{110,183,244-246}. Somit sind die in den Stäbchen-PRs beobachteten Ergebnisse in zweifacher Hinsicht überraschend. Zum einen ist erstaunlich, dass in dem sehr dicht gepackten HC der Stäbchen-PRs überhaupt eine Phosphorylierung von H2AX auftritt. Zum anderen sind γ H2AX-Foci bis 72 h nach Bestrahlung im HCk nachweisbar, obwohl in diesem Zelltyp 5 min nach Bestrahlung mit Titan-Ionen ein Transport von DSBs aus dem HC gezeigt werden konnte.

Somit lassen sich die Ergebnisse aus Schwerionen- und Röntgenbestrahlung nur bedingt miteinander vergleichen. Dies könnte an den unterschiedlich hohen LETs der Strahlenarten liegen. Der höhere LET der Schwerionenbestrahlung führt, wie bereits in Kapitel 5.3. diskutiert, zu einem größeren DNA-Schaden und somit vermutlich auch zu einem größeren DNA-Bereich, der nach dem Auftreten des Schadens relaxiert werden muss. Dadurch kommt es zu einer energetisch noch ungünstigeren Konstellation als nach Schädigung durch Röntgenstrahlung, weshalb der Transport von DSBs an die Peripherie des HCs nach Schwerionenstrahlung schneller erfolgt. Aufgrund dieser Unterschiede ist es auch schwer zu beurteilen, inwieweit es nach Röntgenstrahlung überhaupt zu einem Transport von DSBs kommt. Dementsprechend könnte die innerhalb der ersten 5 h um 40 % abnehmende Anzahl an initial auftretenden γ H2AX-Foci dadurch begründet werden, dass ausschließlich DSBs im EC repariert werden, da lediglich bei den euchromatischen DSBs eine Abnahme zu beobachten ist. Im Gegensatz dazu könnte jedoch auch angenommen werden, dass DSBs aus allen Chromatinbereichen repariert werden. So könnten beispielsweise DSBs im EC reparieren, während DSBs aus dem HCf ins EC und aus dem HCk ins HCf transportiert werden. Da die Anzahl an γ H2AX-Foci im HCk jedoch während der Reparatur gleich bleibt, würde diese Annahme bedeuten, dass H2AX bei einzelnen DSBs im HCk erst zu sehr späten Zeiten nach Bestrahlung phosphoryliert wird. Diese Möglichkeit ist nicht unwahrscheinlich, da das Chromatin der Stäbchen-PRs so dicht gepackt ist, dass es bei den heterochromatischen DSBs durchaus erst zu späteren Zeiten zu einer Phosphorylierung von H2AX kommen könnte. Des Weiteren ist das Volumen des HCs in Stäbchen-PRs im Vergleich zu Mausfibroblasten viel größer, wodurch sich die Strecke verlängert, über die ein DSB an die Peripherie des HCs transportiert werden muss^{184,187}.

Die Untersuchung von LigaseIV-defizienten Stäbchen-PRs, bei denen aufgrund der essentiellen Rolle von LigaseIV im NHEJ alle strahleninduzierten DSBs unrepariert verbleiben sollten, wären für solche Studien sehr aufschlussreich, da eine Anhäufung von DSBs im EC zu späten Zeiten nach Bestrahlung auf einen aktiven Transport heterochromatischer DSBs hinweisen würde^{70,241}. Jedoch konnte bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung von DNA-PK-defizienten Stäbchen-PRs, bei denen ebenfalls DNA-PK als eine essentielle Komponente des NHEJ fehlt, zwischen 30 min und 72 h nach Bestrahlung keine Veränderung der Lokalisation innerhalb des Chromatins und somit auch keine Akkumulation von DSBs im EC gezeigt werden.

Die zu späten Zeiten nach Bestrahlung verbleibenden γ H2AX Foci in den Stäbchen-PRs sind nicht überwiegend an der Peripherie des HCs lokalisiert. Diese Beobachtung ist entgegen den Erwartungen, dass die bei ATM-defizienten Zellen ausbleibende Phosphorylierung von KAP1 und die damit verbundene ausbleibende Lockerung des HCs zu verbleibenden DSBs an der Peripherie des HC führt. Die Identifikation von solchen, an die Peripherie des HCs transportierten DSBs gestaltet sich in den Stäbchen-PRs jedoch schwieriger als angenommen, da das EC in diesen Zellen nur eine schmale Schicht um das zentral konzentrierte HC herum bildet und zusätzlich feine heterochromatische Ausläufer zur Kernmembran hin aufweist¹⁸². Dadurch können aus dem HC stammenden DSBs, welche an die Peripherie des HCs transportiert wurden, in der hier durchgeführten Lokalisationsstudie kaum von den euchromatischen DSBs unterschieden werden. Dafür sprechen auch die verbleibenden DSBs in den Stäbchen-PRs von ATM-defizienten AT-Mäuse, da diese eine vergleichbare Lokalisation wie Stäbchen-PRs von WT-Mäusen aufweisen.

5.4.1. Einfluss von ATM und DNA-PK auf die Phosphorylierung von H2AX innerhalb verschiedener Chromatinbereiche von Stäbchen-PRs der adulten Mausretina

Die strahleninduzierte Phosphorylierung von H2AX um den Bereich eines DSBs spielt eine entscheidende Rolle bei der Schadensantwort^{50,206,247}. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass diese Phosphorylierung in murinen und humanen Zellen in der G0- und G1-Phase ausschließlich von den Kinasen ATM und DNA-PK durchgeführt wird^{194,248}. Dabei kann jede Kinase für sich, auch in Abwesenheit der anderen Kinase, die Phosphorylierung von H2AX ausführen. Für ATM konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese Kinase für die Phosphorylierung von H2AX zu sehr frühen Zeiten (bis 10 min) nach Bestrahlung essentiell ist, während DNA-PK sowohl zu frühen als auch zu späteren Zeiten nach Bestrahlung zur H2AX-Phosphorylierung in der Lage ist¹⁹⁴. Auch in den

Stäbchen-PRs adulter WT-Mäuse konnte im Rahmen dieser Arbeit eine ausschließliche Phosphorylierung von H2AX durch ATM und DNA-PK bestätigt werden.

Um den Einfluss von ATM und DNA-PK auf die Phosphorylierung von H2AX innerhalb verschiedener Chromatinbereiche von Stäbchen-PRs adulter Mäuse zu analysieren wurde die strahleninduzierte Ausbildung von γ H2AX-Foci in ATM-defizienten AT-Mäusen und DNA-PK-defizienten SCID-Mäusen, sowie in Retina-Explantaten, welche mit Inhibitoren für ATM und DNA-PK behandelt wurden, untersucht.

In ATM-defizienten Stäbchen-PRs konnten in den ersten 2 min nach Bestrahlung keine γ H2AX-Foci nachgewiesen werden. Da in Stäbchen-PRs von WT-Mäusen zu diesem Zeitpunkt lediglich γ H2AX-Foci im EC und HCf zu beobachten waren, konnte daraus geschlossen werden, dass die Phosphorylierung von H2AX im EC und HCf zu sehr frühen Zeiten nach Bestrahlung abhängig von ATM ist. Nach einer Zeit von 5 min traten konsistent mit der Studie von *Stiff et al. (2004)* auch in den ATM-defizienten Stäbchen-PRs γ H2AX-Foci auf. Die im Vergleich zu WT-Mäusen verringerte Anzahl von maximal auftretenden γ H2AX-Foci in ATM-defizienten Stäbchen-PRs lässt sich vermutlich damit erklären, dass noch vor der Phosphorylierung von H2AX bereits eine Reparatur von DSBs stattgefunden hat.

In DNA-PK-defizienten Stäbchen-PRs konnte bereits 30 s nach Bestrahlung eine mit den Stäbchen-PRs von WT-Mäusen vergleichbare Anzahl an γ H2AX-Foci ermittelt werden. Diese γ H2AX-Foci befinden sich bis 2 min nach Bestrahlung wie auch bei den WT-Mäusen zu 70-80 % überwiegend im EC und zu 20-30 % im HCf. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Phosphorylierung von H2AX in den Stäbchen-PRs zu sehr frühen Zeiten unabhängig von DNA-PK ist. Dieses Ergebnis ist ebenfalls konsistent mit der Studie von *Stiff et al. (2004)*, bei der Maus-Fibroblasten nach Inhibition von DNA-PK im Vergleich zu DNA-PK-profizienten Zellen keinen Unterschied in der Ausbildung von γ H2AX-Foci nach Bestrahlung zeigen¹⁹⁴. Im Vergleich zu Stäbchen-PRs von WT-Mäusen und ATM-defizienten Stäbchen-PRs sind in DNA-PK-defizienten Stäbchen-PRs zwischen 5-15 min nach Bestrahlung geringfügig mehr γ H2AX-Foci im EC lokalisiert (60-70 %), während im HCk geringfügig weniger γ H2AX-Foci ausgebildet werden (1-3 %). Da auch im weiteren Verlauf der Reparatur eine verminderte Ausbildung von γ H2AX-Foci im HCk zu beobachten war, wurde daraus geschlossen, dass DNA-PK in den Stäbchen-PRs eine Rolle bei der Phosphorylierung von H2AX im HCk spielt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Phosphorylierung von H2AX in den Stäbchen-PRs zu sehr frühen Zeiten nach Bestrahlung (bis 2 min) abhängig von ATM und unabhängig von DNA-PK ist. Ab 5-15 min nach Bestrahlung wird die H2AX-Phosphorylierung, konsistent mit der Studie von *Stiff et al. (2004)*, überlappend von ATM und DNA-PK durchgeführt. Ein bisher unbekannter Befund aus dieser Studie ist die Rolle von DNA-PK bei der Phosphorylierung von H2AX im HCk.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Reference List

1. Kiefer, J. & Kiefer, I. Allgemeine Radiobiologie. Paray Verlag, (2003).
2. Nikjoo, H. & Goodhead, D.T. Track Structure-Analysis Illustrating the Prominent Role of Low-Energy Electrons in Radiobiological Effects of Low-Let Radiations. *Physics in Medicine and Biology* **36**, 229-238 (1991).
3. Kraft, G. Tumor therapy with heavy charged particles. *Progress in Particle and Nuclear Physics, Vol 45, Supplement 2* **45**, S473-S544 (2000).
4. Kraft, G. Tumorthrapy with ion beams. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section A-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment* **454**, 1-10 (2000).
5. Kramer, M. *et al.* Treatment planning for heavy-ion radiotherapy: physical beam model and dose optimization. *Physics in Medicine and Biology* **45**, 3299-3317 (2000).
6. Kraft, G. Tumorthrapy with ion beams. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section A-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment* **454**, 1-10 (2000).
7. Kraft, G. Tumorthrapy with ion beams. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section A-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment* **454**, 1-10 (2000).
8. Hall EJ, G.A. Radiobiology for the Radiologist. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2006).
9. Munro, T.R. Relative Radiosensitivity of Nucleus and Cytoplasm of Chinese Hamster Fibroblasts. *Radiation Research* **42**, 451-& (1970).
10. Hall EJ. Radiobiology for the Radiologist. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2000).
11. Ward, J.F. Dna Damage Produced by Ionizing-Radiation in Mammalian-Cells - Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **35**, 95-125 (1988).
12. Acworth, I.N., Bogdanov, M.B., McCabe, D.R. & Beal, M.F. Estimation of hydroxyl free radical levels in vivo based on liquid chromatography with electrochemical detection. *Oxidants and Antioxidants, Pt B* **300**, 297-313 (1999).
13. Chapman, J.D., Reuvers, A.P., Borsa, J. & GREENSTO, CL. Chemical Radioprotection and Radiosensitization of Mammalian-Cells Growing In-Vitro. *Radiation Research* **56**, 291-306 (1973).
14. Goodhead, D.T. Initial Events in the Cellular Effects of Ionizing-Radiations - Clustered Damage in Dna. *International Journal of Radiation Biology* **65**, 7-17 (1994).
15. Roots, R. & Okada, S. Protection of Dna Molecules of Cultured Mammalian-Cells from Radiation-Induced Single-Strand Scissions by Various Alcohols and Sh Compounds. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics Chemistry and Medicine* **21**, 329-& (1972).

16. Ward,J.F., Blakely,W.F. & Joner,E.I. Mammalian-Cells Are Not Killed by Dna Single-Strand Breaks Caused by Hydroxyl Radicals from Hydrogen-Peroxide. *Radiation Research* **103**, 383-392 (1985).
17. Margaret Knowles,P.S. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. Oxford University Press, (2005).
18. Kegel,P., Riballo,E., Kuhne,M., Jeggo,P.A. & Lobrich,M. X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *Dna Repair* **6**, 1692-1697 (2007).
19. Dahm-Daphi,J., Sass,C. & Alberti,W. Comparison of biological effects of DNA damage induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide in CHO cells. *International Journal of Radiation Biology* **76**, 67-75 (2000).
20. Fisher,A.E.O., Hochegger,H., Takeda,S. & Caldecott,K.W. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 5597-5605 (2007).
21. Mello,A.C., Hoffmann,M.E. & Meneghini,R. Cell Killing and Dna Damage by Hydrogen-Peroxide Are Mediated by Intracellular Iron. *Biochemical Journal* **218**, 273-275 (1984).
22. Teebor,G.W., Boorstein,R.J. & Cadet,J. The Repairability of Oxidative Free-Radical Mediated Damage to Dna - A Review. *International Journal of Radiation Biology* **54**, 131-150 (1988).
23. Friedland,W., Jacob,P., Paretzke,H.G., Merzagora,M. & Ottolenghi,A. Simulation of DNA fragment distributions after irradiation with photons. *Radiation and Environmental Biophysics* **38**, 39-47 (1999).
24. Ward,J.F. The Yield of Dna Double-Strand Breaks Produced Intracellularly by Ionizing-Radiation - A Review. *International Journal of Radiation Biology* **57**, 1141-1150 (1990).
25. Povirk,L.F. DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: Bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **355**, 71-89 (1996).
26. Keeney,S. & Neale,M.J. Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochemical Society Transactions* **34**, 523-525 (2006).
27. Franco,S., Alt,F.W. & Manis,J.P. Pathways that suppress programmed DNA breaks from progressing to chromosomal breaks and translocations. *Dna Repair* **5**, 1030-1041 (2006).
28. Gellert,M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annual Review of Biochemistry* **71**, 101-132 (2002).
29. Khanna,K.K. & Jackson,S.P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics* **27**, 247-254 (2001).
30. Shiloh,Y. ATM and related protein kinases: Safeguarding genome integrity. *Nature Reviews Cancer* **3**, 155-168 (2003).
31. Bianchi,M. *et al.* Evaluation of Radiation-Induced Chromosomal-Aberrations in Human Peripheral-Blood Lymphocytes Invitro - Result of An Iaea-Coordinated Program. *Mutation Research* **96**, 233-242 (1982).

32. Natarajan,A.T. *et al.* Molecular Mechanisms Involved in the Production of Chromosomal-Aberrations .2. Utilization of Neurospora Endonuclease for the Study of Aberration Production by X-Rays in G1 and G2 Stages of the Cell-Cycle. *Mutation Research* **69**, 293-305 (1980).
33. Hoeijmakers,J.H.J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**, 366-374 (2001).
34. van Gent,D.C., Hoeijmakers,J.H.J. & Kanaar,R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature Reviews Genetics* **2**, 196-206 (2001).
35. Lukas,C. *et al.* Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *Embo Journal* **23**, 2674-2683 (2004).
36. Stiff,T. *et al.* Nbs1 is required for ATR-dependent phosphorylation events. *Embo Journal* **24**, 199-208 (2005).
37. Uziel,T. *et al.* Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *Embo Journal* **22**, 5612-5621 (2003).
38. Bakkenist,C.J. & Kastan,M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499-506 (2003).
39. Savitsky,K. *et al.* A Single Ataxia-Telangiectasia Gene with A Product Similar to Pi-3 Kinase. *Science* **268**, 1749-1753 (1995).
40. So,S.R., Davis,A.J. & Chen,D.J. Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage sites. *Journal of Cell Biology* **187**, 977-990 (2009).
41. Kobayashi,J. *et al.* NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Current Biology* **12**, 1846-1851 (2002).
42. Lee,J.H. & Paull,T.T. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**, 551-554 (2005).
43. Burma,S., Chen,B.P., Murphy,M., Kurimasa,A. & Chen,D.J. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 42462-42467 (2001).
44. Rogakou,E.P., Pilch,D.R., Orr,A.H., Ivanova,V.S. & Bonner,W.M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 5858-5868 (1998).
45. Lou,Z.K. *et al.* MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Molecular Cell* **21**, 187-200 (2006).
46. Stucki,M. *et al.* MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* **123**, 1213-1226 (2005).
47. Pilch,D.R. *et al.* Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double strand breaks sites. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie et Biologie Cellulaire* **81**, 123-129 (2003).
48. Rogakou,E.P., Boon,C., Redon,C. & Bonner,W.M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *Journal of Cell Biology* **146**, 905-915 (1999).

49. Downs,J.A., Lowndes,N.F. & Jackson,S.P. A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* **408**, 1001-1004 (2000).
50. Paull,T.T. *et al.* A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology* **10**, 886-895 (2000).
51. Kurz,E.U. & Lees-Miller,S.P. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *Dna Repair* **3**, 889-900 (2004).
52. Niida,H. & Nakanishi,M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* **21**, 3-9 (2006).
53. Huen,M.S.Y. *et al.* RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell* **131**, 901-914 (2007).
54. Mailand,N. *et al.* RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* **131**, 887-900 (2007).
55. Doil,C. *et al.* RNF168 Binds and Amplifies Ubiquitin Conjugates on Damaged Chromosomes to Allow Accumulation of Repair Proteins. *Cell* **136**, 435-446 (2009).
56. Botuyan,M.V. *et al.* Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* **127**, 1361-1373 (2006).
57. Huyen,Y. *et al.* Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* **432**, 406-411 (2004).
58. Pei,H.D. *et al.* MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature* **470**, 124-U144 (2011).
59. Bonner,W.M., Boon,E.P. & Rogakou,E.P. Antibody to histone H2AX phosphorylated on serine 139 detects structures formed immediately after introduction of DNA double-stranded breaks. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 320A (1998).
60. Lobrich,M. *et al.* gamma H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair Strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* **9**, 662-669 (2010).
61. Rothkamm,K., Kruger,I., Thompson,L.H. & Lobrich,M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 5706-5715 (2003).
62. Sedelnikova,O.A., Pilch,D.R., Redon,C. & Bonner,W.M. Histone H2AX in DNA damage and repair. *Cancer Biology & Therapy* **2**, 233-235 (2003).
63. Grudzenski,S., Raths,A., Conrad,S., Rube,C.E. & Lobrich,M. Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 14205-14210 (2010).
64. Rappold,I., Iwabuchi,K., Date,T. & Chen,J.J. Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53Bp1) is involved in DNA damage-signaling pathways (vol 153, pg 613, 2001). *Journal of Cell Biology* **154**, 469 (2001).
65. Schultz,L.B., Chehab,N.H., Malikzay,A. & Halazonetis,T.D. p53 Binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *Journal of Cell Biology* **151**, 1381-1390 (2000).

66. Cromie,G.A., Connelly,J.C. & Leach,D.R.F. Recombination at double-strand breaks and DNA ends: Conserved mechanisms from phage to humans. *Molecular Cell* **8**, 1163-1174 (2001).
67. Haber,J.E. Partners and pathways - repairing a double-strand break. *Trends in Genetics* **16**, 259-264 (2000).
68. Miller,K.M. *et al.* Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nature Structural & Molecular Biology* **17**, 1144-1U15 (2010).
69. Jackson,S.P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks - Commentary. *Carcinogenesis* **23**, 687-696 (2002).
70. Jeggo,P.A. Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiation Research* **150**, S80-S91 (1998).
71. Walker,J.R., Corpina,R.A. & Goldberg,J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412**, 607-614 (2001).
72. Mahaney,B.L., Meek,K. & Lees-Miller,S.P. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochemical Journal* **417**, 639-650 (2009).
73. Smith,G.C.M. & Jackson,S.P. The DNA-dependent protein kinase. *Genes & Development* **13**, 916-934 (1999).
74. DeFazio,L.G., Stansel,R.M., Griffith,J.D. & Chu,G. Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *Embo Journal* **21**, 3192-3200 (2002).
75. Gottlieb,T.M. & Jackson,S.P. The Dna-Dependent Protein-Kinase - Requirement for Dna Ends and Association with Ku Antigen. *Cell* **72**, 131-142 (1993).
76. Weterings,E., Verkaik,N.S., Bruggenwirth,H.T., Hoeijmakers,J.H.J. & van Gent,D.C. The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. *Nucleic Acids Research* **31**, 7238-7246 (2003).
77. Teo,S.H. & Jackson,S.P. Lif1p targets the DNA ligase Lig4p to sites of DNA double-strand breaks. *Current Biology* **10**, 165-168 (2000).
78. Beucher,A. *et al.* ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *Embo Journal* **28**, 3413-3427 (2009).
79. Riballo,E. *et al.* A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Molecular Cell* **16**, 715-724 (2004).
80. Valerie,K. & Povirk,L.F. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* **22**, 5792-5812 (2003).
81. Pfeiffer,P., Goedecke,W., Kuhfittig-Kulle,S. & Obe,G. Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenetic and Genome Research* **104**, 7-13 (2004).
82. D'Amours,D. & Jackson,S.P. The Mre11 complex: At the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**, 317-327 (2002).
83. Sartori,A.A. *et al.* Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **450**, 509-5U6 (2007).

84. Bolderson,E., Richard,D.J., Edelman,W. & Khanna,K.K. Involvement of Exo1b in DNA damage-induced apoptosis. *Nucleic Acids Research* **37**, 3452-3463 (2009).
85. Gravel,S., Chapman,J.R., Magill,C. & Jackson,S.P. DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes & Development* **22**, 2767-2772 (2008).
86. Zhu,Z., Chung,W.H., Shim,E.Y., Lee,S.E. & Ira,G. Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* **134**, 981-994 (2008).
87. Binz,S.K., Sheehan,A.M. & Wold,M.S. Replication Protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *Dna Repair* **3**, 1015-1024 (2004).
88. Sung,P., Krejci,L., Van Komen,S. & Sehorn,M.G. Rad51 recombinase and recombination mediators. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 42729-42732 (2003).
89. Shivji,M.K.K. & Venkitaraman,A.R. DNA recombination, chromosomal stability and carcinogenesis: insights into the role of BRCA2. *Dna Repair* **3**, 835-843 (2004).
90. Yang,H.J. *et al.* BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* **297**, 1837-1848 (2002).
91. Li,X. & Heyer,W.D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research* **18**, 99-113 (2008).
92. Mazin,A.V., Mazina,O.M., Bugreev,D.V. & Rossi,M.J. Rad54, the motor of homologous recombination. *Dna Repair* **9**, 286-302 (2010).
93. Wyman,C., Ristic,D. & Kanaar,R. Homologous recombination-mediated double-strand break repair. *Dna Repair* **3**, 827-833 (2004).
94. Gospodinov,A. & Herceg,Z. Shaping chromatin for repair. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **752**, 45-60 (2013).
95. Dootz,R., Toma,A.C. & Pfohl,T. Structural and dynamic properties of linker histone H1 binding to DNA. *Biomicrofluidics* **5**, (2011).
96. Ferreira,J., Paoletta,G., Ramos,C. & Lamond,A.I. Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: A magnified view of single chromosome territories. *Journal of Cell Biology* **139**, 1597-1610 (1997).
97. Zink,D. *et al.* Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo. *Human Genetics* **102**, 241-251 (1998).
98. Zink,D., Fischer,A.H. & Nickerson,J.A. Nuclear structure in cancer cells. *Nature Reviews Cancer* **4**, 677-687 (2004).
99. Ha,M., Ng,D.W.K., Li,W.H. & Chen,Z.J. Coordinated histone modifications are associated with gene expression variation within and between species. *Genome Research* **21**, 590-598 (2011).
100. Turner,B.M. Defining an epigenetic code. *Nature Cell Biology* **9**, 2-6 (2007).
101. Xhemalce,B. & Kouzarides,T. A chromodomain switch mediated by histone H3 Lys 4 acetylation regulates heterochromatin assembly. *Genes & Development* **24**, 647-652 (2010).

102. Yan,C.H. & Boyd,D.D. Histone H3 acetylation and H3K4 methylation define distinct chromatin regions permissive for transgene expression. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 6357-6371 (2006).
103. Lachner,M., O'Carroll,N., Rea,S., Mechtler,K. & Jenuwein,T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**, 116-120 (2001).
104. Lukas,C., Bartek,J. & Lukas,J. Imaging of protein movement induced by chromosomal breakage: tiny 'local' lesions pose great 'global' challenges. *Chromosoma* **114**, 146-154 (2005).
105. van Attikum,H. & Gasser,S.M. ATP-dependent chromatin remodeling and DNA double-strand break repair. *Cell Cycle* **4**, 1011-1014 (2005).
106. Ziv,Y. *et al.* Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM and KAP-1 dependent pathway. *Nature Cell Biology* **8**, 870-U142 (2006).
107. Clapier,C.R. & Cairns,B.R. The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. *Annual Review of Biochemistry* **78**, 273-304 (2009).
108. Metzger,L. & Iliakis,G. Kinetics of Dna Double-Strand Break Repair Throughout the Cell-Cycle As Assayed by Pulsed Field Gel-Electrophoresis in Cho Cells. *International Journal of Radiation Biology* **59**, 1325-1339 (1991).
109. Goodarzi,A.A., Jeggo,P. & Lobrich,M. The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax. *Dna Repair* **9**, 1273-1282 (2010).
110. Goodarzi,A.A. *et al.* ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Molecular Cell* **31**, 167-177 (2008).
111. Friedman,J.R. *et al.* KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes & Development* **10**, 2067-2078 (1996).
112. Craig,J.M. Heterochromatin-many flavours, common themes. *Bioessays* **27**, 17-28 (2005).
113. Falk,M., Lukasova,E., Gabrielova,B., Ondrej,V. & Kozubek,S. Chromatin dynamics during DSB repair. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1773**, 1534-1545 (2007).
114. Ziv,Y. *et al.* Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM and KAP-1 dependent pathway. *Nature Cell Biology* **8**, 870-U142 (2006).
115. Noon,A.T. *et al.* 53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. *Nature Cell Biology* **12**, 177-U191 (2010).
116. Ayoub,N., Jeyasekharan,A.D., Bernal,J.A. & Venkitaraman,A.R. HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature* **453**, 682-U14 (2008).
117. Ball,A.R. & Yokomori,K. Revisiting the role of heterochromatin protein 1 in DNA repair. *Journal of Cell Biology* **185**, 573-575 (2009).
118. Dinant,C. & Luijsterburg,M.S. The Emerging Role of HP1 in the DNA Damage Response. *Molecular and Cellular Biology* **29**, 6335-6340 (2009).
119. Aten,J.A. *et al.* Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* **303**, 92-95 (2004).

120. Nelms,B.E., Maser,R.S., Mackay,J.F., Lagally,M.G. & Petrini,J.H.J. In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science* **280**, 590-592 (1998).
121. Kruhlak,M.J. *et al.* Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *Journal of Cell Biology* **172**, 823-834 (2006).
122. Jakob,B., Splinter,J., Durante,M. & Taucher-Schoiz,G. Live cell microscopy analysis of radiation-induced DNA double-strand break motion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 3172-3177 (2009).
123. Costes,S.V. *et al.* Image-based modeling reveals dynamic redistribution of DNA damage into nuclear sub-domains. *Plos Computational Biology* **3**, 1477-1488 (2007).
124. Jakob,B. *et al.* DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic Acids Research* **39**, 6489-6499 (2011).
125. Chiolo,I. *et al.* Double-Strand Breaks in Heterochromatin Move Outside of a Dynamic HP1a Domain to Complete Recombinational Repair. *Cell* **144**, 732-744 (2011).
126. Krawczyk,P.M. *et al.* Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks. *Journal of Cell Science* **125**, 2127-2133 (2012).
127. Nambiar,M., Kari,V. & Raghavan,S.C. Chromosomal translocations in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* **1786**, 139-152 (2008).
128. Rabbitts,T.H. Chromosomal Translocations in Human Cancer. *Nature* **372**, 143-149 (1994).
129. Falk,M., Lukasova,E. & Kozubek,S. Higher-order chromatin structure in DSB induction, repair and misrepair. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* **704**, 88-100 (2010).
130. Dahl,K.N., Ribeiro,A.J.S. & Lammerding,J. Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction. *Circulation Research* **102**, 1307-1318 (2008).
131. Herrmann,H. & Foisner,R. Intermediate filaments: novel assembly models and exciting new functions for nuclear lamins. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 1607-1612 (2003).
132. Moir,R.D. & Spann,T.P. The structure and function of nuclear lamins: implications for disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**, 1748-1757 (2001).
133. Broers,J.L.V., Ramaekers,F.C.S., Bonne,G., Ben Yaou,R. & Hutchison,C.J. Nuclear lamins: Laminopathies and their role in premature ageing. *Physiological Reviews* **86**, 967-1008 (2006).
134. Capell,B.C. & Collins,F.S. Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nature Reviews Genetics* **7**, 940-952 (2006).
135. Worman,H.J., Ostlund,C. & Wang,Y.X. Diseases of the Nuclear Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, (2010).
136. Liu,B.H. *et al.* Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nature Medicine* **11**, 780-785 (2005).
137. Mounkes,L.C. & Stewart,C.L. Aging and nuclear organization: lamins and progeria. *Current Opinion in Cell Biology* **16**, 322-327 (2004).

138. Stewart,C.L., Kozlov,S., Fong,L.G. & Young,S.G. Mouse models of the laminopathies. *Experimental Cell Research* **313**, 2144-2156 (2007).
139. Constantinescu,D., Csoka,A.B., Navara,C.S. & Schatten,G.P. Defective DSB repair correlates with abnormal nuclear morphology and is improved with FTI treatment in Hutchinson-Gilford progeria syndrome fibroblasts. *Experimental Cell Research* **316**, 2747-2759 (2010).
140. Sullivan,T. *et al.* Loss of A-type lamin expression compromises nuclear integrity leading to muscular dystrophy. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 237A (1999).
141. Scaffidi,P. & Misteli,T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* **312**, 1059-1063 (2006).
142. Shumaker,D.K. *et al.* Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 8703-8708 (2006).
143. Gonzalez-Suarez,I. *et al.* Novel roles for A-type lamins in telomere biology and the DNA damage response pathway. *Embo Journal* **28**, 2414-2427 (2009).
144. Dahl,K.N. *et al.* Distinct structural and mechanical properties of the nuclear lamina in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 10271-10276 (2006).
145. Eriksson,M. *et al.* Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* **423**, 293-298 (2003).
146. Goldman,R.D. *et al.* Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8963-8968 (2004).
147. Sandre-Giovannoli,A. *et al.* Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* **300**, 2055 (2003).
148. di Masi,A., D'Apice,M.R., Ricordy,R., Tanzarella,C. & Novelli,G. The R527H mutation in LMNA gene causes an increased sensitivity to ionizing radiation. *Cell Cycle* **7**, 2030-2037 (2008).
149. Redwood,A.B. *et al.* A dual role for A-type lamins in DNA double-strand break repair. *Cell Cycle* **10**, 2549-2560 (2011).
150. Goldman,A.E., Moir,R.D., Montaglowy,M., Stewart,M. & Goldman,R.D. Pathway of Incorporation of Microinjected Lamin-A Into the Nuclear-Envelope. *Journal of Cell Biology* **119**, 725-735 (1992).
151. Kirchgessner,C.U. *et al.* Dna-Dependent Kinase (P350) As A Candidate Gene for the Murine Scid Defect. *Science* **267**, 1178-1183 (1995).
152. Sipley,J.D. *et al.* Gene for the Catalytic Subunit of the Human Dna-Activated Protein-Kinase Maps to the Site of the Xrcc7 Gene on Chromosome-8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 7515-7519 (1995).
153. Bosma,M.J. The Scid Mutation - Occurrence and Effect. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **152**, 3-9 (1989).

154. Schuler,W. & Bosma,M.J. Nature of the Scid Defect - A Defective Vdj Recombinase System. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **152**, 55-62 (1989).
155. Bosma,G.C., Custer,R.P. & Bosma,M.J. A Severe Combined Immunodeficiency Mutation in the Mouse. *Nature* **301**, 527-530 (1983).
156. GLANZMANN,E. & RINIKER,P. [Essential lymphocytophthisis; new clinical aspect of infant pathology]. *Ann Paediatr* **175**, 1-32 (1950).
157. Lieberman,M., Hansteen,G.A., Waller,E.K., Weissman,I.L. & Senmajumdar,A. Unexpected Effects of the Severe Combined Immunodeficiency Mutation on Murine Lymphomagenesis. *Journal of Experimental Medicine* **176**, 399-405 (1992).
158. Biedermann,K.A., Sun,J.R., Giaccia,A.J., Tosto,L.M. & Brown,J.M. Scid Mutation in Mice Confers Hypersensitivity to Ionizing-Radiation and A Deficiency in Dna Double-Strand Break Repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 1394-1397 (1991).
159. Fulop,G.M. & Phillips,R.A. The Scid Mutation in Mice Causes A General Defect in Dna-Repair. *Nature* **347**, 479-482 (1990).
160. Rube,C.E. *et al.* DNA Double-Strand Break Repair of Blood Lymphocytes and Normal Tissues Analysed in a Preclinical Mouse Model: Implications for Radiosensitivity Testing. *Clinical Cancer Research* **14**, 6546-6555 (2008).
161. Gatti,R.A. *et al.* Localization of An Ataxia-Telangiectasia Gene to Chromosome 11Q22-23. *Nature* **336**, 577-580 (1988).
162. Lavin,M.F. ATM: the product of the gene mutated in ataxia-telangiectasia. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **31**, 735-740 (1999).
163. Meyn,M.S. Ataxia-telangiectasia, cancer and the pathobiology of the ATM gene. *Clinical Genetics* **55**, 289-304 (1999).
164. Taylor,A.M.R. Unrepaired Dna Strand Breaks in Irradiated Ataxia Telangiectasia Lymphocytes Suggested from Cytogenetic Observations. *Mutation Research* **50**, 407-418 (1978).
165. Barlow,C. *et al.* Atm-deficient mice: A paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* **86**, 159-171 (1996).
166. Elson,A. *et al.* Pleiotropic defects in ataxia-telangiectasia protein-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 13084-13089 (1996).
167. Xu,Y. *et al.* Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes & Development* **10**, 2411-2422 (1996).
168. Kato,T.A., Nagasawa,H., Weil,M.M., Little,J.B. & Bedford,J.S. Levels of gamma-H2AX foci after low-dose-rate irradiation reveal a DNA DSB rejoining defect in cells from human ATM heterozygotes in two AT families and in another apparently normal individual. *Radiation Research* **166**, 443-453 (2006).

-
169. Lobrich,M., Kuhne,M., Wetzel,J. & Rothkamm,K. Joining of correct and incorrect DNA double-strand break ends in normal human and ataxia telangiectasia fibroblasts. *Genes Chromosomes & Cancer* **27**, 59-68 (2000).
 170. Beamish,H. & Lavin,M.F. Radiosensitivity in Ataxia-Telangiectasia - Anomalies in Radiation-Induced Cell-Cycle Delay. *International Journal of Radiation Biology* **65**, 175-184 (1994).
 171. Kastan,M.B. *et al.* A Mammalian-Cell Cycle Checkpoint Pathway Utilizing P53 and Gadd45 Is Defective in Ataxia-Telangiectasia. *Cell* **71**, 587-597 (1992).
 172. Khanna,K.K., Lavin,M.F., Jackson,S.P. & Mulhern,T.D. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death and Differentiation* **8**, 1052-1065 (2001).
 173. Deckbar,D. *et al.* Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *Journal of Cell Biology* **176**, 749-755 (2007).
 174. Jean,D., Ewan,K. & Gruss,P. Molecular regulators involved in vertebrate eye development. *Mechanisms of Development* **76**, 3-18 (1998).
 175. Mey,J. & Thanos,S. Development of the visual system of the chick - I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Research Reviews* **32**, 343-379 (2000).
 176. Nishimura,Y. Determination of the Developmental Pattern of Retinal Ganglion-Cells in Chick-Embryos by Golgi Impregnation and Other Methods. *Anatomy and Embryology* **158**, 329-347 (1980).
 177. Martins,R.A.P. & Pearson,R.A. Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brain Research* **1192**, 37-60 (2008).
 178. Bassett,E.A. & Wallace,V.A. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Trends in Neurosciences* **35**, 565-573 (2012).
 179. Turner,D.L. & Cepko,C.L. A Common Progenitor for Neurons and Glia Persists in Rat Retina Late in Development. *Nature* **328**, 131-136 (1987).
 180. Young,R.W. Cell-Differentiation in the Retina of the Mouse. *Anatomical Record* **212**, 199-205 (1985).
 181. Wassle,H. & Boycott,B.B. Functional Architecture of the Mammalian Retina. *Physiological Reviews* **71**, 447-480 (1991).
 182. Carterdawson,L.D. & Lavail,M.M. Rods and Cones in the Mouse Retina .1. Structural-Analysis Using Light and Electron-Microscopy. *Journal of Comparative Neurology* **188**, 245-262 (1979).
 183. Guenatri,M., Bailly,D., Maison,C. & Almouzni,G. Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *Journal of Cell Biology* **166**, 493-505 (2004).
 184. Solovei,I. *et al.* Nuclear Architecture of Rod Photoreceptor Cells Adapts to Vision in Mammalian Evolution. *Cell* **137**, 356-368 (2009).
 185. Terranova,R., Sauer,S., Merckenschlager,M. & Fisher,A.G. The reorganisation of constitutive heterochromatin in differentiating muscle requires HDAC activity. *Experimental Cell Research* **310**, 344-356 (2005).

186. Solovei,I. *et al.* LBR and Lamin A/C Sequentially Tether Peripheral Heterochromatin and Inversely Regulate Differentiation. *Cell* **152**, 584-598 (2013).
187. Kizilyaprak,C., Spehner,D., Devys,D. & Schultz,P. In Vivo Chromatin Organization of Mouse Rod Photoreceptors Correlates with Histone Modifications. *Plos One* **5**, (2010).
188. Carle,G.F. & Olson,M.V. An Electrophoretic Karyotype for Yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 3756-3760 (1985).
189. Schwartz,D.C. & Cantor,C.R. Separation of Yeast Chromosome-Sized Dnas by Pulsed Field Gradient Gel-Electrophoresis. *Cell* **37**, 67-75 (1984).
190. Rydberg,B., Lobrich,M. & Cooper,P.K. Dna Double-Strand Breaks Induced by High-Energy Neon and Iron Ions in Human Fibroblasts .1. Pulsed-Field Gel-Electrophoresis Method. *Radiation Research* **139**, 133-141 (1994).
191. Lee,J.H., Goodarzi,A.A., Jeggo,P.A. & Paull,T.T. 53BP1 promotes ATM activity through direct interactions with the MRN complex. *Embo Journal* **29**, 574-585 (2010).
192. Ward,I.M. *et al.* 53BP1 cooperates with p53 and functions as a haploinsufficient tumor suppressor in mice. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 10079-10086 (2005).
193. Jeon,C.J., Strettoi,E. & Masland,R.H. The major cell populations of the mouse retina. *Journal of Neuroscience* **18**, 8936-8946 (1998).
194. Stiff,T. *et al.* ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Research* **64**, 2390-2396 (2004).
195. Leemput,J. *et al.* ATM localization and gene expression in the adult mouse eye. *Molecular Vision* **15**, 393-416 (2009).
196. Girard,P.M., Riballo,E., Begg,A.C., Waugh,A. & Jeggo,P.A. Nbs1 promotes ATM dependent phosphorylation events including those required for G1/S arrest. *Oncogene* **21**, 4191-4199 (2002).
197. Anderson,C.W. Dna-Damage and the Dna-Activated Protein-Kinase. *Trends in Biochemical Sciences* **18**, 433-437 (1993).
198. Ward,I.M. & Chen,J.J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 47759-47762 (2001).
199. Zou,L., Liu,D. & Elledge,S.J. Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 13827-13832 (2003).
200. Jazayeri,A. *et al.* ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nature Cell Biology* **8**, 37-U13 (2006).
201. Lourdes Valdés-Sánchez,B.D.I.C.F.J.D.-C.S.M.C.F.C.A.F.W.S.S.B. ATR localizes to the photoreceptor connecting cilium and deficiency leads to severe photoreceptor degeneration in mice. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1507-1515 (2013).

-
202. Schneider,L., Fumagalli,M. & di Fagagna,F.D. Terminally differentiated astrocytes lack DNA damage response signaling and are radioresistant but retain DNA repair proficiency. *Cell Death and Differentiation* **19**, 582-591 (2012).
 203. DiTullio,R.A. *et al.* 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nature Cell Biology* **4**, 998-1002 (2002).
 204. Morales,J.C. *et al.* Role for the BRCA1 C-terminal repeats (BRCT) protein 53BP1 in maintaining genomic stability. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 14971-14977 (2003).
 205. Nakamura,K. *et al.* Genetic dissection of vertebrate 53BP1: A major role in non-homologous end joining of DNA double strand breaks. *Dna Repair* **5**, 741-749 (2006).
 206. Wang,B., Matsuoka,S., Carpenter,P.B. & Elledge,S.J. 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* **298**, 1435-1438 (2002).
 207. Ward,I.M., Minn,K., van Deursen,J. & Chen,J.J. p53 binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 2556-2563 (2003).
 208. Poche,R.A. *et al.* Lim1 is essential for the correct Laminar positioning of retinal horizontal cells. *Journal of Neuroscience* **27**, 14099-14107 (2007).
 209. Reh,T.A. Cellular Interactions Determine Neuronal Phenotypes in Rodent Retinal Cultures. *Journal of Neurobiology* **23**, 1067-1083 (1992).
 210. Silva,A.O., Ercole,C.E. & Mcloon,S.C. Regulation of ganglion cell production by notch signaling during retinal development. *Journal of Neurobiology* **54**, 511-524 (2003).
 211. Gatz,S.A. *et al.* Requirement for DNA Ligase IV during Embryonic Neuronal Development (vol 31, pg 10088, 2011). *Journal of Neuroscience* **31**, 13695 (2011).
 212. Agudo,M. *et al.* Time course profiling of the retinal transcriptome after optic nerve transection and optic nerve crush. *Molecular Vision* **14**, 1050-1063 (2008).
 213. Berkelaar,M., Clarke,D.B., Wang,Y.C., Bray,G.M. & Aguayo,A.J. Axotomy Results in Delayed Death and Apoptosis of Retinal Ganglion-Cells in Adult-Rats. *Journal of Neuroscience* **14**, 4368-4374 (1994).
 214. Bull,N.D. *et al.* Use of an Adult Rat Retinal Explant Model for Screening of Potential Retinal Ganglion Cell Neuroprotective Therapies. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **52**, 3309-3320 (2011).
 215. Rodriguez-Muela,N., Germain,F., Marino,G., Fitze,P.S. & Boya,P. Autophagy promotes survival of retinal ganglion cells after optic nerve axotomy in mice. *Cell Death and Differentiation* **19**, 162-169 (2012).
 216. Casson,R.J., Chidlow,G., Wood,J.P.M., Vidal-Sanz,M. & Osborne,N.N. The effect of retinal ganglion cell injury on light-induced photoreceptor degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **45**, 685-693 (2004).
 217. Chun,M.H. *et al.* Upregulation of ciliary neurotrophic factor in reactive Muller cells in the rat retina following optic nerve transection. *Brain Research* **868**, 358-362 (2000).

218. Goodarzi,A.A., Kurka,T. & Jeggo,P.A. KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response. *Nature Structural & Molecular Biology* **18**, 831-U112 (2011).
219. Popova,E.Y. *et al.* Developmentally Regulated Linker Histone H1c Promotes Heterochromatin Condensation and Mediates Structural Integrity of Rod Photoreceptors in Mouse Retina. *Journal of Biological Chemistry* (2013).
220. Aya Tzur-Gilat,Y.Z.L.M.A.B.Y.S. Studying the cerebellar DNA damage response in the tissue culture dish. *Mechanisms of Ageing and Development* (2013).
221. Ryan,R.F. *et al.* KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 4366-4378 (1999).
222. Cammas,F. *et al.* Mice lacking the transcriptional corepressor TIF1 beta are defective in early postimplantation development. *Development* **127**, 2955-2963 (2000).
223. Cammas,F. *et al.* Cell differentiation induces TIF1 beta association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. *Journal of Cell Science* **115**, 3439-3448 (2002).
224. Gonzalez-Suarez,I. *et al.* A new pathway that regulates 53BP1 stability implicates Cathepsin L and vitamin D in DNA repair. *Embo Journal* **30**, 3383-3396 (2011).
225. Redwood,A.B., Gonzalez-Suarez,I. & Gonzalo,S. Regulating the levels of key factors in cell cycle and DNA repair New pathways revealed by lamins. *Cell Cycle* **10**, 3652-+ (2011).
226. Petanceska,S., Burke,S., Watson,S.J. & Devi,L. Differential Distribution of Messenger-Rnas for Cathepsin-B, Cathepsin-l and Cathepsin-S in Adult-Rat Brain - An In-Situ Hybridization Study. *Neuroscience* **59**, 729-738 (1994).
227. Ericksonlawrence,M., Zabudoff,S.D. & Wright,W.W. Cyclic Protein-2, A Secretory Product of Rat Sertoli Cells, Is the Proenzyme Form of Cathepsin-l. *Molecular Endocrinology* **5**, 1789-1798 (1991).
228. Organisciak,D.T. & Vaughan,D.K. Retinal light damage: Mechanisms and protection. *Progress in Retinal and Eye Research* **29**, 113-134 (2010).
229. Wenzel,A., Grimm,C., Samardzija,M. & Reme,C.E. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* **24**, 275-306 (2005).
230. Tsuruma,K. *et al.* Role of Oxidative Stress in Retinal Photoreceptor Cell Death in N-Methyl-N-nitrosourea-Treated Mice. *Journal of Pharmacological Sciences* **118**, 351-362 (2012).
231. Wang,D., Wang,Z., Li,Y., Chen,X. & Sun,G.Y. Nimodipine inhibits N-methyl-N-nitrosourea-induced retinalphotoreceptor apoptosis in vivo. *Indian Journal of Pharmacology* **45**, 149-154 (2013).
232. Kuro,M. *et al.* Calpain Inhibition Restores Basal Autophagy and Suppresses MNU-induced Photoreceptor Cell Death in Mice. *In Vivo* **25**, 617-623 (2011).

-
233. Yoshizawa,K. *et al.* Mechanisms of photoreceptor cell apoptosis induced by N-methyl-N-nitrosourea in Sprague-Dawley rats. *Laboratory Investigation* **79**, 1359-1367 (1999).
 234. Gorgels,T.G.M.F. *et al.* Retinal degeneration and ionizing radiation hypersensitivity in a mouse model for Cockayne syndrome. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 1433-1441 (2007).
 235. Sannita,W.G. *et al.* Electrophysiological responses of the mouse retina to C-12 ions. *Neuroscience Letters* **416**, 231-235 (2007).
 236. Borges,H.L. & Linden,R. Gamma irradiation leads to two waves of apoptosis in distinct cell populations of the retina of newborn rats. *Journal of Cell Science* **112**, 4315-4324 (1999).
 237. Borges,H.L., Chao,C., Xu,Y., Linden,R. & Wang,J.Y.J. Radiation-induced apoptosis in developing mouse retina exhibits dose-dependent requirement for ATM phosphorylation of p53. *Cell Death and Differentiation* **11**, 494-502 (2004).
 238. Chiarini,L.B., Leal-Ferreira,M.L., de Freitas,F.G. & Linden,R. Changing sensitivity to cell death during development of retinal photoreceptors. *Journal of Neuroscience Research* **74**, 875-883 (2003).
 239. Tronov,V.A., Vinogradova,Y., Loginova,M.Y., Poplinskaya,V.A. & Ostrovsky,M.A. Mechanisms of radioresistance in terminally differentiated cells of mature retina. *Cell Tiss. Biol.* **6**, 219-227 (2012).
 240. Boudard,D.L., Acar,N., Bretillon,L. & Hicks,D. Retinas of the Diurnal Rodent *Arvicanthis ansorgei* Are Highly Resistant to Experimentally Induced Stress and Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **52**, 8686-8700 (2011).
 241. Barnes,D.E., Stamp,G., Rosewell,I., Denzel,A. & Lindahl,T. Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. *Current Biology* **8**, 1395-1398 (1998).
 242. Psonka-Antonczyk,K., Elsasser,T., Gudowska-Nowak,E. & Taucher-Scholz,G. Distribution of Double-Strand Breaks Induced by Ionizing Radiation at the Level of Single DNA Molecules Examined by Atomic Force Microscopy. *Radiation Research* **172**, 288-295 (2009).
 243. Splinter,J. *et al.* Biological dose estimation of UVA laser microirradiation utilizing charged particle-induced protein foci. *Mutagenesis* **25**, 289-297 (2010).
 244. Cowell,I.G. *et al.* gamma H2AX Foci Form Preferentially in Euchromatin after Ionising-Radiation. *Plos One* **2**, (2007).
 245. Falk,M., Lukasova,E. & Kozubek,S. Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to gamma-radiation. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1783**, 2398-2414 (2008).
 246. Vasireddy,R.S., Karagiannis,T.C. & El Osta,A. gamma-radiation-induced gamma H2AX formation occurs preferentially in actively transcribing euchromatic loci. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 291-294 (2010).
 247. Celeste,A. *et al.* Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nature Cell Biology* **5**, 675-U51 (2003).

-
248. Wang,H., Wang,M., Wang,H., B+Åcker,W. & Iliakis,G. Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. *J. Cell. Physiol.* **202**, 492-502 (2005).

7. ANHANG

7.1. Western Blots

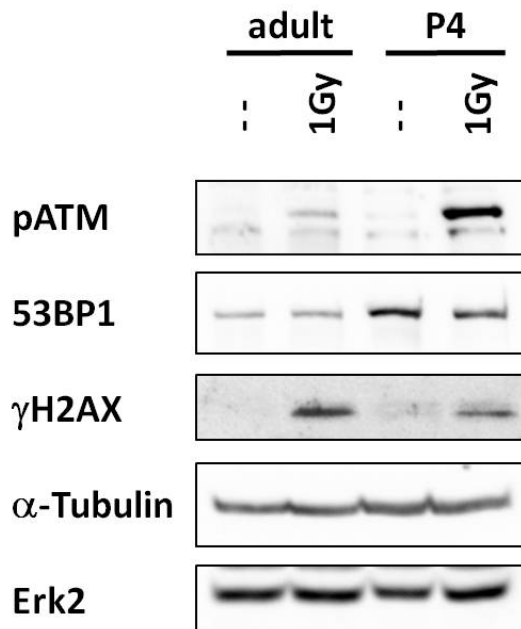


Abbildung A1: Western-Blot-Analyse von DNA-Schadensmarkern in Gesamtzellextrakten adulter und postnataler Mausretinae. Nach der Bestrahlung von Retina-Explantaten mit 1 Gy ist bei den adulten Retinae ein deutlich schwächeres Signal der strahleninduzierten phosphorylierten Form von ATM (pATM) zu beobachten als bei den postnatalen Retinae (P4). Ebenfalls sind die Signale von 53BP1 bei den adulten Mausretinae schwächer ausgeprägt als bei den postnatalen Retinae. Die γ H2AX-Signale sind bei adulten und postnatalen Mausretinae annähernd gleich stark. Bei der Kinase DNA-PK sind in den postnatalen Retinae zwei unterschiedlich starke Signalbanden auf Höhe des DNA-PK-Proteins zu erkennen, wodurch keine genaue Aussage über einen Unterschied in der Signalstärke zwischen adulten und postnatalen Retinae getroffen werden kann. Als Ladekontrollen wurden α -Tubulin und Erk2 verwendet. Die Western-Blot-Analyse wurde durchgeführt von Dr. Steffen C. Naumann und mit dessen freundlicher Genehmigung für die Abbildung in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

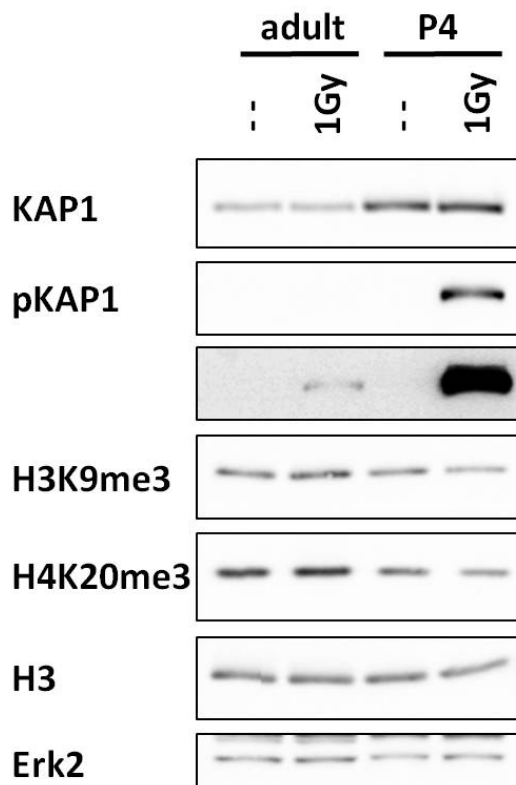


Abbildung A2: Western-Blot-Analyse von Chromatin-bildenden Proteinen und Histon-Modifikationen in Gesamtzellextrakten adulter und postnataler Mausretinae. Der Heterochromation-bildende Faktor KAP1 zeigt in den Proben adulter Retinae ein deutlich schwächeres Signal als in den postnatalen (P4) Retinae. Nach Bestrahlung mit 1 Gy ist in den Retinae adulter Mäuse nur nach hohen Belichtungszeiten ein sehr schwaches strahleninduziertes Signal der phosphorylierten Form von KAP1 (pKAP1) detektierbar, während in den postnatalen Retinae eine starke Signalbande zu beobachten ist. Das Signal der überwiegend im konstitutiven Heterochromatin auftretende Histon-Modifikation H3K9me3 ist bei den adulten Retinae minimal höher als bei den postnatalen Retinae. Die Histonmodifikation H4K20me3, welche sowohl im fakultativen als auch im konstitutiven Heterochromatin zu finden ist, zeigt im Vergleich zu den postnatalen Retinae ein leicht stärkeres Signal bei den adulten Retinae. Als Ladekontrollen wurden das Histon H3 und Erk2 verwendet. Die Western-Blot-Analyse wurde durchgeführt von Dr. Steffen C. Naumann und mit dessen freundlicher Genehmigung für die Abbildung in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

7.2. Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Markus Löbrich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seinem Labor angefertigt haben zu dürfen, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und seine Unterstützung.

Herrn Prof. Gerhard Thiel möchte ich für die Übernahme des Koreferats danken.

Bei Frau Dr. Dorothee Deckbar möchte ich mich für ihre fachliche und emotionale Unterstützung in jeglicher Hinsicht, sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle TAs des Labors für deren fleißige Arbeit und Geduld. Besonders möchte ich mich bei Frau Christel Braun für ihren aufopfernden Einsatz bei der Anfertigung der Gewebeschnitte bedanken.

Besonderer Dank gebührt Herrn Dr. Steffen C. Naumann für die Durchführung und Bereitstellung der im Anhang dieser Arbeit gezeigten Western Blots. Vielmehr möchte ich dir für deine Freundschaft, dein immer offenes Ohr und den Spaß bei der Arbeit danken. Western Baby.

Herrn Dr. Sandro Conrad möchte ich für seine fachliche Unterstützung danken. Darüber hinaus danke ich dir für deine Freundschaft und den Spaß den wir besonders außerhalb der Arbeit hatten.

Ich bedanke mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Löbrich für ein angenehmes Betriebsklima und die gute Zusammenarbeit.

Meinen lieben Eltern danke ich von ganzem Herzen dafür, dass ihr immer an mich glaubt und mich in allem unterstützt.

Aus tiefstem Herzen danke ich Herrn Dr. Florian Frohns. Danke für deine Betreuung, für die zahlreichen fachlichen Diskussionen ob bei Tag oder Nacht, für deine unermüdliche Unterstützung, für deinen unentwegten Forschungs-Enthusiasmus, das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie für deine Geduld mit mir. All dies hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke, dass du mein bester Freund und schärfster Kritiker bist.

Vielen Dank an meine liebe Freundin und Kollegin Frau Dr. Anja Heselich. Du bist immer für mich da und rettest mich aus der Not.

Ebenso möchte ich mich bei meinen lieben Mädels Frau Dr. Verena Orth und Frau Dr. Doreen Köhler bedanken-die Macht der 3 wird ewig währen.

Danke Oskar, Rumo und Agathe sowie dem allwissendem Olaf Harald und seiner Frieda Sophie.

7.3. Lebenslauf

Name Antonia Frohns geb. Raths
Geburtsdatum 13.12.1981
Geburtsort Riesa

Berufstätigkeit im Rahmen der Promotion

03/2008 – 03/2013 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
TU-Darmstadt
Institut für Strahlenbiologie und DNA-Reparatur
AG Prof. Markus Löbrich
03/2007 – 03/2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
TU-Darmstadt
Institut für Entwicklungsbiologie und Neurogenetik
AG Prof. Paul G. Layer

Akademische Ausbildung

10/2000 – 03/2007 Fachrichtung: Biologie (Diplom)
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Studienschwerpunkt: Zoologie und Neurobiologie
Abschluss: Diplom

Schulbildung

08/1992 – 06/2000 Sophiengymnasium Weimar
Abschluss: Abitur

7.4. Publikationen

Frohns A, Frohns F, Naumann SC, Layer PG and Löbrich M; Inefficient repair of DNA double-strand breaks in murine rod photoreceptors with highly heterochromatic DNA devoid of KAP1. *Manuscript ready for submission*.

Heslich A, Frohns F, Frohns A, Naumann SC and Layer PG; Near-infrared Exposure Changes Cellular Responses to Ionizing Radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 2012, 88(1): 135-146)

Raths A, Bock A, Grudzenski S, Deckbar D, Conrad S, Löbrich M; Localization of DNA Double-Strand Breaks in Mouse Tissues after X-irradiation. *GSI Scientific Report* 2011-1

Grudzenski S, Raths A, Conrad S, Rübe CE, Löbrich M; Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 10; 107(32): 14205-10

Grudzenski S, Raths A, Rübe CE, Löbrich M; Repair of DNA Double-Strand Breaks in Mouse Tissues after Low dose irradiation. *GSI Scientific Report* 2010-1

Raths A, Grudzenski S and Löbrich M; DNA Double-Strand Break Quantification and Localization in Mouse Tissues. *GSI Scientific Report* 2009-1

Raths A and Paysan J; The influence of ionizing radiation on the cytology, proliferation and differentiation of olfactory stem cells *in vitro*. *GSI Scientific Report* 2008-1

7.5. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 23.07.2013

.....